



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Androesterilidad ligada a la obtención de frutos partenocárpicos en cultivares comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Presentada por:

MÓNICA MEDINA HERRANZ

Para optar al título de

DOCTOR por la

Universidad Politécnica de Valencia

Directores:

**Dr. José Pío Beltrán Porter
Dr. Luis Antonio Cañas Clemente
Dra. M^a Concepción Gómez Mena**

Valencia, 2010



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

D. José Pío Beltrán Porter, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Investigación del CSIC, D. Luis Cañas Clemente, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador Científico del CSIC y Dña. M^a Concepción Gómez Mena, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Ramón y Cajal, todos ellos en el Instituto de Biología Molecular de Plantas (Universidad Politécnica- Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

CERTIFICAN que,

Doña Mónica Medina Herranz, Ingeniera Agrónoma, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título “Androesterilidad ligada a la obtención de frutos partenocárpicos en cultivares comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 12 de Abril de 2010.

Fdo: Dr. José Pío Beltrán Porter

Fdo: Dr. Luis Antonio Cañas Clemente

Fdo: Dra. M^a Concepción Gómez Mena

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas me han ayudado de diferentes formas en las diversas etapas de esta Tesis doctoral. En general, quisiera agradecer a todas ellas los momentos que han vivido conmigo en la realización de este trabajo, con sus altos y bajos, y que, tanto ellos como yo sabemos que les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y, sobre todo, cariño y amistad. Y, aunque es difícil nombrarlas porque puedo caer en el error de olvidarme de alguna de ellas, creo que sería injusto que su nombre no apareciera explícitamente en esta sección. Porque forman parte activa de este trabajo, quiero dar las gracias:

A los Doctores José Pío Beltrán y Luis Cañas, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo, por la formación recibida y por su disponibilidad para solucionar cuestiones, tanto de tipo científicas como técnicas o burocráticas. Gracias por permitirme cumplir uno de mis sueños.

A la Doctora M^a Concepción Gómez-Mena, sin ella tampoco hubiera conseguido terminar esta Tesis. Gracias por la paciencia que has tenido conmigo, sobre todo en esta última etapa de escritura y, gracias por la revisión crítica y exhaustiva de este manuscrito, te aseguro que he aprendido mucho con ella.

A mis queridos compañeros del laboratorio 2.01, para los que soy Moneymaker. Con ellos he recorrido total o parcialmente este camino, a los que estuvieron, Amparo, Begoña, Teresa, Claudia. A los que están y con los que he formado una pequeña familia: M^a Cruz, por estar siempre disponible y dispuesta a ayudar en todo aquello que se te pide y, por aportarme siempre una visión diferente de las cosas. A Edelín, gracias por ver siempre el lado positivo y, sobre todo gracias porque tu trabajo previo me ha dado la oportunidad de introducirme en el apasionante mundo del tomate. A Roberto y Joanna, con los que he compartido y comparto las mismas experiencias, tanto personales como profesionales. En ellos he encontrado a unos buenos amigos que espero conservar durante toda mi vida; los tres nos hemos apoyado y animado cada vez que uno lo necesitaba. Espero celebrar pronto con vosotros el final de vuestros trabajos y que sepáis que estoy aquí para todo lo que necesitéis.

A Auri, Marjan y a nuestras compañeras de almuerzo: Marisol y M.D., porque, gracias a vosotras, el almuerzo se convierte en el mejor momento de la mañana.

A todo el personal que conforma el laboratorio de Cultivos Celulares: Gracias al Dr. Vicente Moreno, por permitirme trabajar con ellos y acogerme y tratarme como a

una más en su laboratorio; a los que están, Begoña, Teresa, Peter, Álex y a los que estuvieron, Rosa, Yania y Mar. Gracias a Benito Pineda, por estar siempre disponible y pendiente de mí y de mi trabajo, gracias porque trabajar contigo es un placer, transmites entusiasmo por tu trabajo y lo contagias a los que te rodean.

A la gente del laboratorio del Dr. Antonio Granell, en especial a Clara Pons y Sophie Mirabel, por su paciencia y disposición para resolver cualquier pregunta referente al análisis de micromatrices. A José Luis Rambla y M^a Aurora Medina, por su disponibilidad y amabilidad incondicional conmigo, tanto a nivel personal como a la hora de realizar el análisis de compuestos volátiles, muchas gracias de corazón.

A todo el personal del IBMCP, tanto de Administración como de Servicios: Biblioteca, Mantenimiento, Limpieza, Secuenciación, Invernadero, Microscopía, Genómica y Metabolómica, ya que, dentro del ámbito que a cada uno le compete, me han ayudado sin ponerme ningún impedimento. En especial, a Rafa, por cuidar y mimar con tanto esmero a mis tomateras; a Teresa Caballero y Vicente Guardiola, por su ayuda y buen hacer en el análisis de Metabolitos primarios. Gracias al Dr. José Luis García Martínez por su ayuda y buenos consejos en la realización de los tratamientos hormonales.

A todos mis amigos agronómicos, ellos entienden bien el trabajo de laboratorio y, me han acompañado en momentos personales importantes en mi vida. Que sepáis que siempre estaréis conmigo: Ana, María, Teresa, Inés, Silvia, Fernando, Guillem, Bernardo, Yoli, Andrés, Vicente y Salva.

A mi familia: tíos, primos, cuñados, sobrinos... gracias por intentar entender este mundo de la investigación, por raro que parezca, y, por apoyarme en todas las decisiones. En especial, a mis primos Rafa, Aurora y Sofía.

A mi abuela Aurora y a mi tía Marcelina, porque ellas me están enseñando lo que significa envejecer con la mayor sencillez y alegría.

A Paco, porque, a lo mejor la realización de esta Tesis ha sido sólo una excusa que se ha puesto en mi camino para conocerte, quererte, respetarte y formar parte de mi familia. Estoy muy orgullosa de ti y, tengo la suerte de contar con tu ayuda, tanto en el terreno profesional como en el personal. Gracias por todo el tiempo que me has dedicado para conseguir que esta Tesis saliera para delante.

A mis padres, Antonio Medina y Mónica Herranz, un agradecimiento muy especial por todo. Por su comprensión y ayuda en los momentos malos y menos malos. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el

intento. Me han dado todo lo que soy como persona: mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y, todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Espero que estéis orgullosos de mí papis.

A mi hermana, M^a Aurora Medina, a ella especialmente le dedico esta Tesis doctoral. Es la persona que mejor me conoce, que sabe cuando estoy alegre, triste, que me anima cuando lo necesito y que me escucha cuando necesito desahogarme, conocerme mejor que ella es, sencillamente imposible. Gracias por la paciencia, consejos, comprensión, alegría; siempre has estado a mi lado, desde antes de que yo naciera y, espero que siempre estés conmigo. Sabes que las palabras se quedan cortas para agradecerte todo lo que te mereces. Esta Tesis va por ti y por mí, por nosotras.

A mi Javi, por ser la persona que comparte más tiempo a mi lado, porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas y, porque gracias a él soy capaz de conseguir el equilibrio que me permite dar lo máximo de mí. Nunca te podré estar lo suficientemente agradecida y, también te quiero dedicar este trabajo terminado en compensación por el tiempo que por él te he robado.

El presente trabajo ha sido financiado por una Beca de Formación de Personal Investigador, concedida por la Universidad Politécnica de Valencia.

Mónica

*A mis Padres
A mi hermana
A Javi*

*Vosotros sois, sin duda,
mi referencia para el
presente y para el futuro*

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XVI
RESÚMENES.....	XVIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. El tomate.....	1
1.1. Origen y domesticación.....	1
1.2. Taxonomía.....	2
1.3. Características generales.....	2
1.3.1. Morfología de la planta.....	2
1.3.2. Morfología del fruto.....	3
1.3.3. Composición del fruto.....	4
1.4. Fructificación.....	6
1.4.1. Polinización.....	6
1.4.2. Fecundación.....	6
1.5. Desarrollo del fruto.....	8
1.6. Control hormonal de la fructificación.....	9
1.6.1. Las auxinas y la fructificación en tomate.....	10
1.6.2. Las giberelinas y la fructificación en tomate.....	12
2. Partenocarpia en tomate.....	17
2.1. Tipos y fuentes de partenocarpia.....	17
2.2. Relación entre los genes homeóticos florales y la partenocarpia.....	19
2.3. La androesterilidad y la partenocarpia.....	21
2.3.1. Definición y tipos de androesterilidad.....	21
2.3.2. Importancia de la androesterilidad en especies hortícolas.....	23
2.3.3. Obtención de plantas androestériles mediante ingeniería genética.....	24
3. Características de calidad en tomate.....	27
3.1. Tomates para consumo en fresco.....	27
3.1.1. Caracteres vegetativos y reproductivos.....	27
3.1.2. Caracteres del fruto.....	28
3.1.2.1. Calidad externa.....	29
3.1.2.2. Calidad interna.....	30
3.1.2.3. Calidad nutritiva.....	33
3.2. Tomates para procesado industrial.....	34
3.2.1. Caracteres vegetativos y reproductivos.....	34

3.2.2. Caracteres del fruto.....	35
3.2.2.1. Calidad externa.....	35
3.2.2.2. Calidad interna.....	36
3.2.2.3. Calidad nutritiva.....	37
4. Estado actual de la calidad organoléptica del tomate y objetivos de mejora.....	37
5. Dificultades de la mejora de la calidad organoléptica en tomate y perspectivas de futuro.....	38
6. El tomate como sistema modelo para estudios del desarrollo.....	42
6.1. Genómica funcional en plantas.....	43
6.2. Colecciones de ESTs y micromatrices de DNA.....	44
6.3. Aproximación genómico-funcional al desarrollo del fruto de tomate.....	46
II. OBJETIVOS.....	48
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1. Material vegetal y su manipulación.....	49
1.1. Material vegetal.....	49
1.2. Condiciones de cultivo.....	49
1.3. Polinización cruzada.....	50
1.4. Recolección de ovarios en diferentes estadios del desarrollo floral.....	50
1.5. Tratamientos hormonales.....	51
1.6. Preparación de muestras vegetales para microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.....	52
1.6.1. Microscopía electrónica de barrido.....	52
1.6.2. Microscopía óptica.....	53
2. Cepas bacterianas.....	53
2.1. Transformación de cepas bacterianas.....	54
3. Métodos de biología molecular.....	54
3.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	54
3.1.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	55
3.1.2. Extracción de DNA genómico de tomate.....	55
3.1.3. Extracción de RNA total de ovarios de tomate.....	56
3.2. Southern blot.....	56
3.2.1. Digestión del DNA genómico.....	56
3.2.2. Electroforesis en gel de agarosa y transferencia a membrana.....	56

3.2.3. Marcaje de sondas radioactivas.....	57
3.2.4. Hibridación y autoradiografías.....	57
3.3. Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	57
4. Transformación genética de tomate.....	58
4.1. Construcción utilizada para la transformación genética.....	58
4.2. Método de transformación.....	59
4.2.1. Esterilización de semillas.....	59
4.2.2. Obtención de plántulas axénicas y extracción de explantes de cotiledón.....	59
4.2.3. Cultivo de explantes primarios.....	60
4.2.4. Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación.....	60
4.2.5. Cocultivo.....	60
4.2.6. Inducción de organogénesis.....	61
4.2.7. Propagación clonal.....	61
4.2.8. Aclimatación en condiciones de invernadero.....	62
5. Soluciones minerales, soluciones vitamínicas y medios de cultivo.....	62
5.1. Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962).....	62
5.2. Solución vitamínica.....	62
5.3. Medios de cultivo.....	63
5.4. Medios de cultivo específicos para la transformación genética.....	63
6. Caracterización del material vegetal.....	64
6.1. Evaluación del nivel de sensibilidad a kanamicina.....	64
6.2. Evaluación del nivel de ploidía.....	64
6.3. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i>	64
6.3.1. Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo.....	65
6.3.2. Análisis de viabilidad de los granos de polen de plantas de tomate.....	67
7. Evaluación de las características de calidad de los frutos de plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i>	67
7.1. Contenido en sólidos solubles.....	68
7.2. Acidez titulable.....	69
7.3. Índice de sabor.....	69
7.4. Medición del color por colorimetría.....	69

7.5. Análisis de compuestos volátiles mediante GC-MS.....	71
7.5.1. Material vegetal.....	71
7.5.2. Preparación de las muestras.....	71
7.5.3. Separación e identificación: Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).....	72
7.5.4. Cuantificación.....	73
7.5.5. Análisis estadístico.....	73
7.6. Análisis de metabolitos primarios.....	73
7.6.1. Material vegetal.....	73
7.6.2. Extracción de metabolitos.....	73
7.6.3. Derivatización.....	73
7.6.4. Detección y separación.....	74
7.6.5. Identificación y cuantificación.....	74
7.6.6. Análisis estadístico.....	74
8. Análisis de la expresión génica mediante micromatrices de DNA.....	75
8.1. Diseño del experimento con micromatrices.....	75
8.2. Descripción de la micromatriz empleada.....	76
8.3. Amplificación y marcaje del RNA.....	77
8.4. Hibridación de las micromatrices.....	78
8.5. Lavado de los cristales.....	78
8.6. Obtención de los datos de las micromatrices.....	79
8.6.1. Exploración y análisis de imagen.....	79
8.6.2. Análisis estadístico de los datos.....	80
8.6.3. Análisis de agrupamiento.....	81
9. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	82
IV. RESULTADOS.....	84
1. Obtención de plantas transgénicas androestériles de <i>Solanum lycopersicum</i> ..	84
1.1. Transformación de <i>Solanum lycopersicum</i> con la construcción <i>PsEND1::barnasa</i>	84
2. Caracterización molecular de las plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i>	88
2.1. Amplificación fragmento <i>barnasa</i> mediante PCR.....	88
2.2. Análisis Southern de las plantas transgénicas <i>PsEND1::barnasa</i>	89

3. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i>	91
3.1. Características del desarrollo vegetativo.....	92
3.1.1. Altura de las plantas.....	92
3.2. Características del desarrollo reproductivo.....	93
3.2.1. Tiempo de floración.....	93
3.2.2. Número de inflorescencias por planta.....	95
3.2.3. Número de flores por inflorescencia.....	96
3.2.4. Morfología de la flor.....	97
3.2.5. Morfología de las anteras de las plantas <i>PsEND1::barnasa</i>	98
3.2.6. Morfología y análisis de viabilidad de los granos de polen.....	99
3.3. Fructificación de las plantas <i>PsEND1::barnasa</i>	101
3.3.1. Estudio histológico del desarrollo del ovario.....	101
3.3.2. Papel de las giberelinas en el desarrollo del ovario transgénico <i>PsEND1::barnasa</i>	104
4. Evaluación de las características físicas de calidad de los frutos de plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i>	106
4.1. Peso medio de los frutos, número total de frutos por planta y peso total frutos por planta.....	107
4.2. Anchura, altura y ratio anchura/altura de los frutos.....	110
4.3. Cicatriz peduncular y altura de los hombros de los frutos.....	113
4.4. Espesor del pericarpo y de la piel de los frutos.....	116
4.5. Número de lóculos de los frutos.....	116
5. Evaluación de las características de calidad del fruto procesado de los frutos de plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i>	118
5.1. Contenido en sólidos solubles (°Brix).....	118
5.2. Acidez titulable.....	119
5.3. Índice de sabor.....	121
5.4. Color.....	122
5.5. Análisis de compuestos volátiles de los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> mediante GC-MS.....	128
5.5.1. Identificación de compuestos volátiles en frutos de tomate.....	128
5.5.2. Separación de los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> en base a su perfil de volátiles.....	129

5.5.3. Análisis de los compuestos volátiles significativos en los genotipos (MMK TR 39.1, MMK TR 59.1, MMK TR 26.1 y MMK TR 38.1).....	132
5.6. Análisis de metabolitos primarios en los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 mediante GC-MS.....	137
5.6.1. Identificación de metabolitos primarios.....	137
5.6.2. Separación de los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> en base a su perfil de metabolitos primarios.....	137
5.6.3. Análisis de los metabolitos primarios en los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1.....	139
6. Análisis transcriptómico del desarrollo temprano del ovario de plantas transgénicas de tomate <i>PsEND1::barnasa</i>	143
6.1. Diseño experimental y obtención del material vegetal.....	143
6.2. Anotación funcional de la micromatriz TOM2.....	144
6.3. Estudio del transcriptoma de los ovarios <i>PsEND1::barnasa</i> en diferentes estadios de desarrollo.....	146
6.3.1. Identificación y análisis de los genes expresados diferencialmente.	146
6.3.2. Clasificación funcional de los unigenes.....	149
6.3.3. Visualización de los cambios transcripcionales mediante el programa Mapman.....	152
6.4. Agrupamiento de los genes expresados diferencialmente en función de patrones comunes de expresión temporal.....	172
7. Análisis de la expresión de genes relacionados con giberelinas y auxinas en ovarios de plantas <i>PsEND1::barnasa</i> mediante qRT-PCR.....	174
7.1. Genes que codifican enzimas del metabolismo de las GAs.....	175
7.2. Genes de señalización de auxinas pertenecientes a las familias Aux/IAA y ARF.....	179
V. DISCUSIÓN.....	182
1. Androesterilidad en plantas transgénicas <i>PsEND1::barnasa</i>	183
2. La ablación temprana de las anteras en plantas transgénicas de tomate <i>PsEND1::barnasa</i> provoca el desarrollo de frutos partenocárpicos.....	184
3. La producción de los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> es similar a la de los genotipos silvestres.....	187
4. Los frutos de las plantas <i>PsEND1::barnasa</i> presentan mayor índice de sabor que los frutos silvestres.....	189

5. Los frutos partenocárpicos de plantas <i>PsEND1::barnasa</i> muestran algunas modificaciones en el color.....	190
6. Los frutos de los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 presentan cambios importantes en el perfil de volátiles y metabolitos primarios.....	191
7. La formación de frutos partenocárpicos <i>PsEND1::barnasa</i> está asociada a importantes cambios transcripcionales en estadios tempranos del desarrollo del ovario.....	194
8. Auxinas y giberelinas participan en el desarrollo partenocárpico de los frutos de plantas <i>PsEND1::barnasa</i>	196
VI. CONCLUSIONES.....	202
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	205
VIII. ANEXOS.....	232

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Composición del fruto de tomate maduro.....	5
Tabla 2. Contenido de vitaminas de los frutos frescos de tomate.....	5
Tabla 3. Fuentes potenciales de partenocarpia en tomate.....	18
Tabla 4. Composición de la solución nutritiva suministrada mediante el agua de riego.....	49
Tabla 5. Concentraciones ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de los distintos antibióticos utilizados en la selección de colonias bacterianas recombinantes.....	54
Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos, fragmentos a amplificar y tamaño de los amplicones (pb) obtenidos en las amplificaciones por PCR.....	58
Tabla 7. Genotipos transgénicos <i>PsEND1::barnasa</i> y testigos internos de la transformación del cv. Moneymaker evaluados en condiciones de invernadero.....	66
Tabla 8. Caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo utilizados para fenotipar las plantas <i>PsEND1::barnasa</i> y compararlos con los de las plantas silvestres.....	66
Tabla 9. Caracteres de calidad de fruto evaluados para llevar a cabo el fenotipado de los genotipos transgénicos <i>PsEND1::barnasa</i> y compararlos con los silvestres.....	67
Tabla 10. Muestras problema objeto de estudio en el análisis transcriptómico de los ovarios silvestres y transgénicos en diferentes estadios de desarrollo.....	75
Tabla 11. Oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación por qRT-PCR de cDNA de genes de interés.....	83
Tabla 12. Resultados de las transformaciones genéticas de los cultivares p73 y Moneymaker con la construcción <i>PsEND1::barnasa</i>	86
Tabla 13. Genotipos, enzimas de restricción y nº de bandas obtenidas en el análisis Southern de los genotipos transgénicos pertenecientes a tres cultivares estudiados.....	90
Tabla 14. Peso medio total de frutos por planta, nº de frutos medio por planta y peso medio de los frutos para el genotipo silvestre y los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> del cv. Micro-Tom estudiados.....	108
Tabla 15. Peso medio total de frutos por planta, nº de frutos medio por planta y peso medio de los frutos para el genotipo silvestre y los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> del cv. p73 estudiados.....	109

Tabla 16. Peso medio total de frutos por planta, nº de frutos medio por planta y peso medio de los frutos para el genotipo silvestre y los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> del cv. Moneymaker estudiados.....	110
Tabla 17. Nº medio de lóculos \pm errores estándar de los frutos de plantas transgénicas y silvestres del cv. Micro-Tom.....	116
Tabla 18. Nº medio de lóculos \pm errores estándar de los frutos de plantas transgénicas y silvestres del cv. p73.....	117
Tabla 19. Nº medio de lóculos \pm errores estándar de los frutos de plantas transgénicas y silvestres del cv. Moneymaker.....	117
Tabla 20. Contenido en sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix), acidez titulable (%) e índice de sabor de frutos de tomate de diferentes genotipos transgénicos y del genotipo silvestre del cultivar Micro-Tom (MT).....	121
Tabla 21. Contenido en sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix), acidez titulable (%) e índice de sabor de frutos de tomate de diferentes genotipos transgénicos, el genotipo silvestre y el testigo interno del cultivar p73.....	121
Tabla 22. Resultados promedio del contenido en sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix), acidez total (%) e índice de sabor de frutos de tomate de diferentes genotipos del cultivar Moneymaker.....	122
Tabla 23. Coordenadas cromáticas (L^* , a^* , b^*) y atributos cromáticos (a^*/b^* , TCI y ΔE) de los diferentes genotipos transgénicos y del genotipo silvestre del cv. Micro-Tom (MT).....	123
Tabla 24. Coordenadas cromáticas (L^* , a^* , b^*) y atributos cromáticos (a^*/b^* , TCI y ΔE) de los diferentes genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. p73.....	124
Tabla 25. Coordenadas cromáticas (L^* , a^* , b^*) y atributos cromáticos (a^*/b^* , TCI y ΔE) de los diferentes genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. Moneymaker.....	126
Tabla 26. Clasificación funcional de los unigenes representados en la micromatriz TOM2 según el programa Mapman (Thimm <i>et al</i> , 2004).....	145
Tabla 27. Clasificación funcional de los unigenes expresados diferencialmente en los ovarios transgénicos en los cinco estadios de desarrollo estudiados según el programa Mapman (Thimm <i>et al</i> , 2004)	151
Tabla 28. Unigenes expresados diferencialmente en ovarios <i>PsEND1::barnasa</i> en el estadio 1 de desarrollo implicados en el metabolismo, regulación, respuesta y transporte de giberelinas y auxinas.....	167

Tabla 29. Genes expresados diferencialmente en ovarios *PsEND1::barnasa* en el estadio 4 de desarrollo implicados en el metabolismo, regulación, respuesta y transporte de giberelinas y auxinas..... 170

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal de un fruto de tomate	3
Figura 2. Esquema de los procesos de polinización, fecundación y fructificación..	7
Figura 3. Desarrollo del fruto de tomate	8
Figura 4. Mecanismo molecular de acción de las auxinas.....	11
Figura 5. Esquema general del metabolismo de las GAs y su compartimentalización subcelular	13
Figura 6. Fenotipos de androesterilidad en tomate	23
Figura 7. Estadios del desarrollo floral de <i>Solanum lycopersicum</i>	51
Figura 8. Representación esquemática de la construcción pBI101- <i>PsEND1::barnasa</i>	59
Figura 9. Refractómetro de mano ATAGO	68
Figura 10. Colorímetro (HunterLab) utilizado para medir el color de los frutos	70
Figura 11. Diseño experimental para el análisis transcriptómico del desarrollo de ovarios silvestres y transgénicos	76
Figura 12. Respuesta organogénica en explantes de cotiledón inoculados (cv. Moneymaker) cultivados en medio organogénico en presencia de kanamicina.....	85
Figura 13. Regeneración <i>in vitro</i> de brotes individualizados del cv. Moneymaker..	85
Figura 14. Plantas transgénicas del cultivar Moneymaker de tomate.....	87
Figura 15. Respuesta organogénica en explantes de cotiledón no inoculados (cv. Moneymaker) cultivados en medio organogénico sin presión de selección.....	88
Figura 16. Respuesta de los explantes de cotiledón de tomate (cv. Moneymaker) no inoculados cultivados en medio selectivo en presencia de kanamicina.....	88
Figura 17. Amplificación del fragmento <i>barnasa</i> del genoma de plantas <i>PsEND1::barnasa</i> de tomate (cv. Moneymaker).....	89
Figura 18. Análisis Southern del genotipo silvestre y del genotipo transgénico p73 TR1 del cv. p73 digerido con <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> e hibridado con cDNA del gen <i>barnasa</i>	90
Figura 19. Frutos de tomate de los diferentes cultivares estudiados.....	91
Figura 20. Altura media de las plantas pertenecientes a los genotipos silvestres y transgénicos a las 18 semanas de cultivo.....	93
Figura 21. Tiempo ontogénico de floración medido a las 8 semanas de cultivo en invernadero para los genotipos silvestres y transgénicos.....	94
Figura 22. Número de inflorescencias por planta a las 18 semanas de cultivo en invernadero.....	95

Figura 23. Número de flores por inflorescencia a las 18 semanas de cultivo en invernadero.....	96
Figura 24. Fenotipo de flores de tomate de plantas transgénicas <i>PsEND1::barnasa</i>	97
Figura 25. Análisis de las características morfológicas de anteras de plantas silvestres y <i>PsEND1::barnasa</i> del cv. Micro-Tom, mediante microscopía electrónica de barrido	98
Figura 26. Tipos celulares encontrados en la anteras silvestres y <i>PsEND1::barnasa</i> del cv. Micro-Tom	99
Figura 27. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido de los sacos polínicos y de los granos de polen pertenecientes a anteras silvestres y <i>PsEND1::barnasa</i> (genotipo MT TR 9L) del cv. Micro-Tom	100
Figura 28. Tinción vital con acetato de carmín del polen de plantas de MT TR 9L (cv. Micro-Tom).....	101
Figura 29. Sección transversal de un ovario de tomate	101
Figura 30. Comparación entre ovarios silvestres (izquierda) y ovarios transgénicos (derecha) del cv. Moneymaker en los estadios de desarrollo 1(A), 2(D), 3(G) y 4(J). Cortes histológicos de los ovarios silvestres (B, E, H, K) y ovarios transgénicos (C, F, I, L).....	103
Figura 31. Efecto de las giberelinas en el desarrollo del ovario silvestre del cv. Micro-Tom de tomate recogidos 20 días después de la antesis.....	105
Figura 32. Efecto de las giberelinas en el desarrollo de los ovarios transgénicos <i>PsEND1::barnasa</i> del cv. Micro-Tom de tomate recogidos 20 días después de la antesis	105
Figura 33. Frutos de tomate de los tres cultivares estudiados	106
Figura 34. Atributos físicos evaluados en el fruto de tomate	107
Figura 35. Forma de los frutos genotipos transgénicos y del genotipo silvestre del cv. Micro-Tom.....	111
Figura 36. Forma de los frutos transgénicos y silvestres del cv. p73.....	112
Figura 37. Forma de los frutos transgénicos y silvestres del cv. Moneymaker.....	113
Figura 38. (A) Diámetro de la cicatriz peduncular y (B) Altura de los hombros de los frutos de las plantas transgénicas frente a los de las planta silvestres en el cv. Micro-Tom.....	114
Figura 39. (A) Diámetro de la cicatriz peduncular y (B) altura de los hombros de los frutos de las plantas transgénicas frente a los de las plantas silvestres en el cv. p73.....	114

Figura 40. (A) Diámetro de la cicatriz peduncular y (B) altura de los hombros de los frutos de las plantas transgénicas frente a los de las plantas silvestres en el cv. Moneymaker	115
Figura 41. Contenido en sólidos solubles (°Brix) de los frutos de los genotipos de tomate evaluados pertenecientes a diversos cultivares.....	119
Figura 42. Acidez titulable (% de ácido cítrico) \pm errores estándar correspondientes a frutos transgénicos de los tres cultivares estudiados.....	120
Figura 43. Comparaciones múltiples con intervalos LSD (diferencia mínima significativa) con un nivel de confianza del 95% para (A) la croma (C^*_{ab}) y (B) el tono (h^*_{ab}) de los genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. Micro-Tom.....	124
Figura 44. Comparaciones múltiples con intervalos LSD (diferencia mínima significativa) con un nivel de confianza del 95% para (A) la croma (C^*_{ab}) y (B) el tono (h^*_{ab}) de los genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. p73.....	125
Figura 45. Comparaciones múltiples con intervalos LSD (diferencia mínima significativa) con un nivel de confianza del 95% para (A) la croma (C^*_{ab}) y (B) el tono (h^*_{ab}) de los genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. Moneymaker.....	127
Figura 46. Cromatograma (HS-SPME-GC-MS).....	128
Figura 47. Análisis de componentes principales (PCA) de los 8 genotipos transgénicos de tomate, los genotipos silvestres utilizados como testigos internos de la transformación (MMK TI 1.1 y MMK TI 6.1) y el genotipo silvestre (MMK)....	130
Figura 48. Representación gráfica de las dos primeras componentes principales (PCA) para los 27 compuestos volátiles que fueron significativos en nuestro análisis.....	131
Figura 49. Concentración de los compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre los genotipos transgénicos MMK TR 39.1, MMK TR 59.1 y el genotipo silvestre.....	133
Figura 50. Concentración de los compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre los genotipos transgénicos MMK TR 26.1, MMK TR 38.1 y el genotipo silvestre.....	135
Figura 51. Análisis de componentes principales (PCA) para las dos primeras componentes principales de las réplicas biológicas pertenecientes a los 2 genotipos transgénicos de tomate y el genotipo silvestre.....	138
Figura 52. Representación gráfica de las dos primeras componentes principales (PCA) para los 26 metabolitos primarios identificados.....	139

Figura 53. Valores relativos de los metabolitos primarios analizados en el genotipo MMK 39.1 respecto al genotipo silvestre.....	140
Figura 54. Valores relativos de los metabolitos primarios analizados en el genotipo MMK 59.1 respecto al genotipo silvestre.....	141
Figura 55. Cambios generales de expresión en ovarios transgénicos <i>PsEND1::barnasa</i> respecto a los ovarios silvestres durante los 5 estadios de desarrollo estudiados.....	146
Figura 56. Diagramas de Venn mostrando la distribución de los unigenes inducidos y reprimidos en base a los resultados del experimento de micromatrices para los 5 estadios de desarrollo estudiados.....	148
Figura 57. Visualización, mediante el programa Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos asociados con el metabolismo de los ovarios <i>PsEND1::barnasa</i> comparándolos con los ovarios silvestres.....	153
Figura 58. Visualización, mediante el programa Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos asociados con los mecanismos de regulación de los ovarios <i>PsEND1::barnasa</i> comparándolos con los ovarios silvestres.....	154
Figura 59. Visualización, mediante el programa Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos correspondientes a factores de transcripción y a otras proteínas de unión a DNA en los ovarios <i>PsEND1::barnasa</i> , en el estadio 1 de desarrollo comparándolos con los ovarios silvestres.....	162
Figura 60. Visualización, mediante el programa Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos correspondientes a factores de transcripción y a otras proteínas de unión a DNA en los ovarios <i>PsEND1::barnasa</i> , en el estadio 4 de desarrollo comparándolos con los ovarios silvestres.....	164
Figura 61. Análisis de agrupamiento no jerárquico según mapas auto-organizativos (SOMs) de los datos de expresión de los genes expresados diferencialmente durante los 5 estadios de desarrollo estudiados.....	172
Figura 62. Expresión de genes de biosíntesis de GAs, <i>SIGA20ox</i> , durante el desarrollo temprano del ovario.....	176
Figura 63. Expresión de los genes de biosíntesis de GAs, <i>SIGA3ox</i> , durante el desarrollo temprano del ovario.....	177
Figura 64. Expresión de los genes de degradación de GAs, <i>SIGA2ox</i> , durante el desarrollo temprano del ovario.....	179
Figura 65. Expresión de 2 genes de la familia AUX/IAA de respuesta a auxinas durante el desarrollo temprano del ovario.....	180
Figura 66. Expresión de 2 genes de respuesta a auxinas de la familia ARF durante el desarrollo temprano del ovario.....	181

Figura 67. Dos modelos alternativos que muestran el papel de *AtARF8* y *SIARF7* en la fructificación (Adaptado de De Jong *et al.*, 2009)..... 200

ABREVIATURAS

μF	microfaradio
μg	microgramo
μL	microlitro
μm	micrometro
μCi	microcurie
ABA	Ácido abcísico
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
α-[³² P]dCTP	Trifosfato desoxicitosina marcado en posición α con fósforo 32
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	DNA complementario
cm	centímetro
CTAB	N-Cetil-N, N,N-Trimetilamonio Bromuro
cv.	cultivar
Cy	Cianina
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilen-diamino-tetraacetato sódico
eV	electronvoltio
g	gramo
GA ₃	Ácido giberélico
GAs	Giberelinas
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
h	hora
HR	Humedad relativa
HS-SPME-GC-MS	Microextracción en fase sólida sobre el espacio de cabeza acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas
IAA	Ácido indolacético
kb	kilobase
kV	kilovoltio
LB	Luria Bertoni (medio de cultivo bacteriano)
M	Molar
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
mg	miligramo
min	minuto
mJ	milijulio
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MS	Murashige y Skoog (medio de cultivo de plantas)
N	Normal
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	nanómetro
<i>nptII</i>	gen que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa
°C	grados centígrados
pb	pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)
PCB	Paclbutrazol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVP	Polivinilpirrolidona
p/V	peso/volumen
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
r.p.m.	revoluciones por minuto

RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
s	segundo
SAM	“Significance Analysis of Microarrays”
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	“Scanning Electron Microscopy” (microscopía electrónica de barrido)
SOM	“Self Organizing Maps” (mapas auto-organizativos)
SSC	Tampón salino de citrato sódico (Na ₃ citrato 0,15 M pH 7, NaCl 1,5M)
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
U	Unidades
UTP	Uridina trifosfato
UV	Ultravioleta
V	Voltio
Ω	Ohmio

Resúmenes



Resumen

El promotor del gen *PsEND1* de guisante se expresa de forma específica en tejidos que conforman la arquitectura de la antera desde estadios tempranos del desarrollo. En el presente trabajo hemos fusionado el promotor *PsEND1* con el gen citotóxico *barnasa* para producir ablación celular temprana en las anteras y obtener plantas transgénicas androestériles *PsEND1::barnasa* en cultivares de tomate con interés agronómico-comercial. Este procedimiento biotecnológico indujo el desarrollo de frutos partenocárpicos en las plantas androestériles mostrando que existe una relación entre la androesterilidad temprana y el desarrollo autónomo del ovario en esta especie.

La aplicación de inhibidores de biosíntesis de GAs en ovarios *PsEND1::barnasa* no polinizados, tales como el paclobutrazol, bloqueó la fructificación y desarrollo del fruto, efecto que fue revertido mediante la aplicación de GA₃.

Se ha realizado un análisis de la producción y la calidad de los genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa* de los cultivares Micro-Tom, p73 y Moneymaker, comparándolos con sus respectivos genotipos silvestres. En los cultivares Micro-Tom y Moneymaker la producción de los genotipos *PsEND1::barnasa* y los genotipos silvestres fue similar. En los genotipos transgénicos se produjeron frutos de menor peso y tamaño que los frutos silvestres, pero también un mayor número de frutos por planta. Los genotipos silvestres produjeron un menor número de frutos pero de mayor peso y tamaño.

El contenido en sólidos solubles (expresado en °Brix) fue mayor en los genotipos *PsEND1::barnasa* mientras que la acidez titulable fue igual o menor en los genotipos transgénicos que en los silvestres. El índice de sabor del fruto, estimado mediante la relación °Brix/acidez titulable, fue elevado en los frutos de todos los genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa*, indicando que estos frutos tendrían mejor sabor que los frutos de los genotipos silvestres.

Los análisis de compuestos volátiles mostraron que los genotipos transgénicos presentaban cambios importantes en el perfil de compuestos volátiles. Los compuestos derivados de carotenoides, lípidos y algunos compuestos fenólicos fueron más abundantes en los genotipos transgénicos. Estos compuestos están asociados con notas florales, notas frutales y notas frescas, por tanto, los frutos partenocárpicos *PsEND1::barnasa* analizados podrían tener un aroma más afrutado y floral que los frutos de los genotipos silvestres. Otros compuestos fenólicos (metilsalicilato y etilsalicilato) y los derivados de leucina e isoleucina, en general, han disminuido en los genotipos transgénicos respecto a los silvestres. Estos compuestos están asociados con estadios inmaduros del fruto y aportan sensación de estancamiento o de

ambiente viciado. Esta disminución indicaría una mayor calidad organoléptica de los frutos partenocárpico de tomate.

El análisis de metabolitos primarios, realizado con las dos líneas *PsEND1::barnasa* que más diferían respecto al genotipo silvestre, reveló un incremento en el contenido de aminoácidos y azúcares en los genotipos transgénicos evaluados. Este incremento indicaría que los frutos de estos genotipos tendrían mayor valor nutritivo y mejor sabor que los frutos silvestres.

Por otra parte, se ha realizado un análisis transcriptómico global en ovarios *PsEND1::barnasa* y silvestres en diferentes estadios de desarrollo que mostró que el desarrollo del fruto partenocárpico *PsEND1::barnasa* es similar al que presenta el silvestre después de ser polinizado. En el estadio 1 de desarrollo (5-6 días antes de la antesis) se detectaron cambios de expresión de 1.940 genes, gran parte de ellos relacionados con procesos de regulación. Entre ellos cabe destacar un elevado número de genes relacionados con metabolismo, regulación y transporte de auxinas y giberelinas así como diversos factores de transcripción reprimidos pertenecientes a la familia MADS-box.

El análisis de los niveles de transcritos de genes relacionados con la biosíntesis y degradación de GAs en los ovarios *PsEND1::barnasa* indicaron que, en el estadio 1 de desarrollo, los ovarios transgénicos presentaban niveles incrementados de los transcritos de *SIGA20ox1*, *SIGA3ox1*, *SIGA2ox2* y *SIGA2ox4*. De la misma manera, el análisis de los niveles de transcritos de genes relacionados con auxinas mostró que, en los ovarios transgénicos disminuyeron los niveles de transcritos de los genes *SIIAA9* y *SIARF7*. Estos resultados muestran la implicación de auxinas y GAs en el desarrollo temprano del fruto *PsEND1::barnasa*.

Summary

The *PsEND1* is an anther-specific gene from pea that displays very early expression in anther primordium cells. We fused the *PsEND1* promoter region to the cytotoxic *barnase* gene to induce specific ablation of cell layers where the *PsEND1* is expressed and consequently produces male sterile plants. Expression of the chimaeric *PsEND1::barnase* gene in two tomato cultivars with agronomical/commercial interest produced male-sterile flowers and parthenocarpic fruits. This observation suggests that early male-sterility in tomato is related to the induction of parthenocarpic fruits.

The application of GA biosynthesis inhibitors (paclobutrazol) to *PsEND1::barnase* ovaries blocked fruit growth and fruit-set, an effect that was reversed by the application of GA₃.

We have analyzed the fruit production and fruit quality of the transgenic lines obtained in three cultivars: Micro-Tom, p73 and Moneymaker. In general, fruits from transgenic plants showed smaller weight and size compared to control fruits but these transgenic lines produce more fruits per plant than the control. Therefore, total fruit production of all transgenic genotypes was similar to the control ones.

Parthenocarpic transgenic fruits showed higher soluble solids content (°Brix) but similar or lower titratable acidity than control fruits. The ratio soluble solid content/ titratable acidity has been used as an index of the flavour of fruits; a high ratio was correlated with a sweet taste. The index flavour was higher in all transgenic fruits so the transgenic fruits might have better flavour than control ones.

Volatile profiles of transgenic fruits were very different from control fruits. Transgenic fruits showed more abundant volatiles derived from a diverse set of lipid, carotenoid and phenolic compounds than the control lines. These compounds have been described to provide a floral, frutal and fresh aroma. These changes suggest that parthenocarpic fruits have more organoleptic value than control ones.

Other phenolics compounds and volatiles derivated from phenylalanine, leucine and isoleucine were less abundant in the transgenic lines. These compounds have been correlated with the descriptors "green tomato" or "grassy" and contribute negatively to tomato flavour. Thus, a reduction of these compounds could be a positive aspect of the transgenic fruits.

We analyzed primary metabolites of two genotypes with a particularly striking difference in the profile of volatiles. The results showed that these transgenic lines have more content of all analyzed amino acids and sugars than control ones. These changes suggest that parthenocarpic fruits have more organoleptic value and better taste than control ones.

On the other hand the development of the *PsEND1::barnase* ovary has been analyzed at transcriptome level to study the link between parthenocarpic fruit set and male-sterility in tomato. Our results suggest that the ovary development in *PsEND1::barnase* plants is similar to the one in the pollinated ovary. In the stage 1 (5-6 days before anthesis) we have identified 1.940 genes differentially regulated compared to control genotype were identified. Many of these genes are involved in metabolism, regulation and transport of auxins and gibberellins. These results show the implication of auxins and gibberellin in the early fruit set in *PsEND1::barnase* tomato plants.

At stage 1, the analysis of genes related with GAs biosynthesis and deactivation shows that transcript levels of *SIGA20ox1*, *SIGA3ox1*, *SIGA2ox1* and *SIGA2ox4* were higher in transgenic ovaries than control ones. Besides the expression of genes related auxins such as *SIIAA9* and *SIARF7* were lower in transgenic ovaries than control ovaries at stage 1. Also, we have identified some MADS-box transcription factors.

Resum

El promotor del gen *PsEND1* de pèsol s'expressa de forma específica en teixits que conformen l'arquitectura de l'antera des d'estadis primerencs del desenvolupament. En el present treball hem fusionat el promotor *PsEND1* amb el gen citotòxic *barnasa* per produir ablació cel·lular primerenca a les antereres i obtenir plantes transgèniques androestèrils *PsEND1::barnasa* en cultivars de tomaca amb interès agronòmic i comercial. Aquest procediment biotecnològic va induir el desenvolupament de fruits partenocàrpics en les plantes androestèrils, la qual cosa va mostrar que hi ha relació entre l'androesterilitat primerenca i el desenvolupament autònom de l'ovari en aquesta espècie.

L'aplicació d'inhibidors de biosíntesi de GA en ovaris *PsEND1::barnasa* no pol·linitzats, com ara el paclobutrazol, va bloquejar la fructificació i el desenvolupament de l'ovari, efecte que va ser revertit mitjançant l'aplicació de GA₃.

S'ha portat a terme una anàlisi de la producció i la qualitat dels genotips transgènics *PsEND1::barnasa* dels cultivars Micro-Tom, p73 i Moneymaker, que s'han comparat amb els genotips silvestres respectius. En els cultivars Micro-Tom i Moneymaker la producció dels genotips *PsEND1::barnasa* i els genotips silvestres va ser similar. En els genotips transgènics es van produir fruits de pes i grandària menors que els fruits silvestres, però també s'hi obtingué un major nombre de fruits per planta. Els genotips silvestres van produir un menor nombre de fruits, però de pes i grandària majors.

El contingut en sòlids solubles (expressat en °Brix) va ser major en els genotips *PsEND1::barnasa*, mentre que l'acidesa titulable va ser igual o menor en els genotips transgènics respecte dels silvestres. L'índex de sabor del fruit, estimat mitjançant la relació °Brix / acidesa titulable, va ser elevat en els fruits de tots els genotips transgènics *PsEND1::barnasa*, cosa que indicaria que aquests fruits tenen millor sabor que els dels genotips silvestres.

Les anàlisis de compostos volàtils van mostrar que els genotips transgènics presentaven canvis importants en el perfil de compostos volàtils. Els compostos derivats de carotenoides, lípids i alguns compostos fenòlics van ser més abundants en els genotips transgènics. Aquests compostos s'associen a notes florals, notes de fruita i notes fresques; per tant, els fruits partenocàrpics *PsEND1::barnasa* analitzats podrien tenir una aroma més afruitada i floral que els fruits dels genotips silvestres. Altres compostos fenòlics (metilsalicilat i etilsalicilat) i els derivats de leucina i isoleucina, en general, han disminuït en els genotips transgènics respecte als silvestres. Aquests compostos s'associen a estadis immadurs del fruit i hi aporten sensació d'estancament

o d'ambient viciat. Aquesta disminució indicaria una major qualitat organolèptica dels fruits partenocàrpics de tomaca.

L'anàlisi de metabòlits primaris, que es va fer amb les dues línies *PsEND1::barnasa* que més diferien respecte del genotip silvestre, va revelar un increment en el contingut d'aminoàcids i sucres en els genotips transgènics avaluats. Aquest increment indicaria que els fruits d'aquests genotips tindrien més valor nutritiu i millor sabor que els fruits silvestres.

D'altra banda, es va fer una anàlisi transcriptòmica global en ovaris *PsEND1::barnasa* i silvestres en diferents estadis de desenvolupament que va mostrar que el desenvolupament del fruit partenocàrpic *PsEND1::barnasa* és similar al que presenta el silvestre després de ser pol·linitzat. En l'estadi 1 de desenvolupament (5-6 dies abans de l'antesi) es van detectar canvis d'expressió de 1.940 gens, gran part dels quals es relacionen amb processos de regulació. Entre aquests es pot destacar un elevat nombre de gens relacionats amb el metabolisme, la regulació i el transport d'auxines i gibberel·lines, així com diversos factors de transcripció reprimits pertanyents a la família MADS-box.

L'anàlisi dels nivells de transcrits de gens relacionats amb la biosíntesi i la degradació de GA en els ovaris *PsEND1::barnasa* va indicar que, en l'estadi 1 de desenvolupament, els ovaris transgènics presentaven nivells incrementats dels transcrits de *SIGA20ox1*, *SIGA3ox1*, *SIGA2ox2* i *SIGA2ox4*. De la mateixa manera, l'anàlisi dels nivells de transcrits de gens relacionats amb auxines va mostrar que en els ovaris transgènics van disminuir els nivells de transcrits dels gens *SIIAA9* i *SIARF7*. Aquests resultats mostren la implicació d'auxines i GAs en el desenvolupament primerenc del fruit *PsEND1::barnasa*.

I. Introducción



I. INTRODUCCIÓN

1. El tomate

1.1. Origen y domesticación

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es oriundo de las zonas templadas de América, concretamente de la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile, aunque parece que fue en México donde se domesticó. La introducción del tomate al continente europeo ocurrió, probablemente, a través de España, entre 1523, año de la conquista de México, y 1524, año en el que aparecieron las primeras descripciones publicadas por el botánico italiano Pietro Mattioli. De acuerdo con estas referencias, los primeros tomates que se cultivaron en Italia eran de color amarillo y se llamaron "pomo d'oro" (manzana dorada), término que originó el actual nombre italiano "pomodoro". Los italianos fueron los primeros en cultivar tomate y, probablemente los primeros que los utilizaron en la alimentación humana, a mediados del siglo XVIII (Vallejo, 1999).

En el siglo XVI e inicios del siglo XVII, el tomate fue cultivado en los jardines de Europa (Italia, Inglaterra, España y Francia) como ornamental, por la belleza de sus frutos y como afrodisíaco. Durante un siglo o más fue considerado como venenoso, probablemente por la presencia de tomatina, un alcaloide que se encuentra en sus hojas y frutos inmaduros.

En 1753 el naturalista Kart Linnaeus le asignó al tomate el nombre científico de *Solanum lycopersicum* ("melocotón de lobo"). En el año 1768 los botánicos adoptaron para el tomate el nombre científico de *Lycopersicum esculentum*, que se traduce literalmente como "melocotón de lobo que se puede comer" (Peralta y Spooner, 2007).

Actualmente el tomate es la hortaliza más consumida a nivel mundial, tanto en fresco como en conserva, y, por tanto, la de mayor valor económico. Su éxito radica en que ha alcanzado una extensa variedad de tipos, y posee excelentes cualidades para integrarse en la preparación de infinidad de alimentos, ya sean cocinados o crudos. Su demanda aumenta continuamente en todo el mundo, y con ella su cultivo, producción y comercio. Por este motivo, en la actualidad se cultivan varios cientos de cultivares e híbridos de tomate que se han ido desarrollando como respuesta a la diversidad de la demanda que presenta el mercado. Según fuentes de la FAO, la superficie mundial del tomate (fresco y de transformación) en 2008 fue de más de 5 millones de hectáreas, con una producción de 129,6 millones de toneladas y un rendimiento medio de 24,799 kilos por hectárea.

1.2. Taxonomía

El tomate es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas. Muchas de las especies que comprende tienen un gran valor para el hombre por sus propiedades alimenticias (patata, pimiento, berenjena, tomate), por sus alcaloides (tabaco, estramonio, belladona, beleño, mandrágora) y como plantas de jardín (datura, petunia).

La taxonomía aceptada es la siguiente (Foolad, 2007):

REINO: *Plantae*
Subreino: *Traqueobinta*
Superdivisión: *Spermatophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Subclase: *Asteridae*
Orden: *Solanales*
Suborden: *Solanineae*
Familia: *Solanaceae*
Género: *Solanum*
Especie: *S. lycopersicum*

En 1753 Linnaeus, clasificó al tomate cultivado en el género *Solanum*, por estar estrechamente relacionado con la belladona y la mandrágora. Un año después, el tomate cultivado se clasificó en el género *Lycopersicon* y la especie *esculentum* (Miller, 1754), lo que ayudó a aceptar a esta planta como comestible. En un principio, el género *Lycopersicon* se distinguió del género *Solanum* por diversos caracteres diferenciales de hojas y anteras. El primero se caracteriza por presentar hojas pinnadas y dehiscencia lateral de las anteras; el segundo tiene hojas con tendencia a ser simples y la dehiscencia de las anteras se produce por un poro apical. Las relaciones filogenéticas entre *Solanum* y *Lycopersicon* han sido objeto de polémica durante muchos años. Recientemente, basándose en datos morfológicos y moleculares se ha admitido el nombre de *Solanum lycopersicum* para el tomate cultivado mientras que, las otras especies del género *Lycopersicon* han sido incorporadas al género *Solanum* (Foolad, 2007 y referencias de este artículo).

1.3. Características generales

1.3.1. Morfología de la planta

El tomate es una planta perenne que se cultiva como anual; puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta y el crecimiento es limitado (variedades determinadas) e ilimitado (variedades indeterminadas). Su sistema radicular está compuesto por una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. En el tallo principal se desarrollan hojas, tallos

secundarios e inflorescencias. Las hojas son compuestas e imparipinnadas, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado. La flor es perfecta, regular e hipogina y consta del mismo número de sépalos que de pétalos (de color amarillo). Los estambres, que se desarrollan fusionados formando un cono estaminal, envuelven al gineceo, con un ovario bi o plurilocular. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso, denominadas dicasio y se unen al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, distinguible por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del córtex.

1.3.2. Morfología del fruto

El fruto es una baya de forma globular, ovoide o aplastada, bi o plurilocular. El tamaño y la forma del mismo varía en función de la variedad y de las condiciones de desarrollo. La separación del fruto de la planta en la recolección puede realizarse por la zona de abscisión o por la zona peduncular de unión al fruto.

El fruto adulto de tomate está constituido, básicamente por el pericarpio, el tejido locular, placenta y semillas (Figura 1). El pericarpio lo componen la pared externa, las paredes radiales o septos que separan los lóculos y la pared interna o columela. El pericarpio se origina de la pared del ovario y consta de un exocarpo o piel, un mesocarpo parenquimático con haces vasculares y el endocarpo constituido por una capa unicelular que rodea los lóculos. El exocarpo está compuesto por una epidermis que no posee estomas, y varias capas subepidérmicas de tipo colenquimático. A la epidermis la cubre una fina cutícula que engrosará a medida que se desarrolla el fruto (Wilson y Sterling, 1976). La epidermis presenta tricomas que desaparecen durante la maduración.

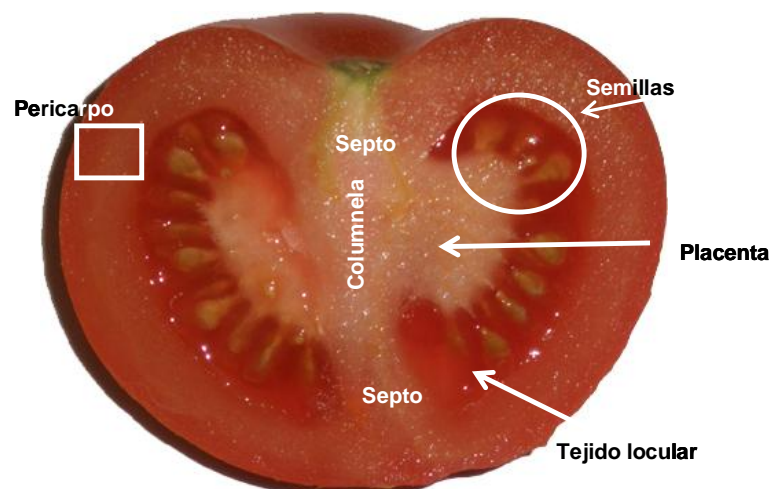


Figura 1. Corte transversal de un fruto de tomate. Se observan el pericarpio, los septos, las semillas en contacto con la placenta rodeadas de tejido locular, y en el eje central se encuentra la columela.

El mesocarpo de la pared externa está compuesto principalmente por células parenquimáticas y los haces vasculares. El endocarpo se compone de una capa celular que delimita las cavidades loculares. Las cavidades loculares son huecos en el pericarpo y contienen las semillas, cubiertas por el tejido placentario. El tejido locular colinda con la placenta (dado que surge a partir de ésta) y comienza a expandirse durante el desarrollo dentro de los lóculos hasta rodear completamente las semillas. Éstas se componen del embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal que suele ser un tejido duro con pelos. Ésta es la capa más externa de la semilla derivada a partir del tegumento que rodea inicialmente al óvulo (Chamarro, 1995). El tegumento es un tejido de varias capas: una interna, una externa y una zona de tejido en el medio de estas dos. Su función principal es proteger al embrión y las sustancias de reserva (Esau, 1976).

El fruto tiene dos sistemas vasculares principales; uno que se extiende desde el pedicelo por la pared externa del pericarpo y el otro que va a las semillas a través de las paredes radiales y la columnela. El sistema vascular se compone principalmente de tubos de floema y vasos de xilema con presencia de traqueidas.

1.3.3. Composición del fruto

El tomate es un alimento poco energético, apenas aporta 20 calorías por cada 100 gramos. Aproximadamente el 95% de su peso fresco es agua y la disponibilidad de agua por la planta puede influir en el tamaño del fruto. El segundo componente mayoritario en el tomate son los hidratos de carbono, que representan cerca de un 4% de su peso fresco. Se considera una fruta-hortaliza, ya que su aporte de azúcares simples es superior al de otras verduras, lo que le confiere un ligero sabor dulce. La glucosa y la fructosa son los principales azúcares presentes, representan el 50% de la materia seca. Los ácidos orgánicos, principalmente cítrico y málico, representan más del 10% de la materia seca (Mahakun *et al.*, 1979) y le otorgan el sabor ácido característico. Azúcares y ácidos orgánicos representan la casi totalidad de los sólidos solubles del fruto de tomate. El tomate es una fuente importante de fibra, minerales como el potasio, calcio, magnesio y fósforo y, sobre todo de sustancias con actividad antioxidante (vitaminas, pigmentos y compuestos fenólicos). En la Tabla 1 se muestra información sobre los principales constituyentes nutritivos del tomate.

Tabla 1. Composición del fruto de tomate maduro (Abushita *et al.*, 1997; Davies y Hobson, 1981)


Contenido (g/100g peso seco)	
Glucosa	22
Fructosa	25
Sacarosa	1
Proteínas	8
Pectinas	7
Celulosa y hemicelulosa	10
Ácido cítrico	9
Ácido málico	4
Minerales (K ⁺ , Ca ⁺² , Mg ⁺² , P)	8
Lípidos	2
Vitaminas	0,5
Pigmentos	0,4
Otros	3,1

El tomate en fresco es una fuente de vitaminas, entre las que destaca la C, la E, la A y las vitaminas del grupo B, en especial B1, B5 y B3 (Tabla 2). Además, presenta un alto contenido en carotenos como el β -caroteno y el licopeno, pigmento que aporta al tomate su color rojo característico. El licopeno constituye cerca del 80-90% del contenido total de carotenoides de los tomates maduros (Shi y Marguer, 2000). El β -caroteno, precursor en la dieta de vitamina A, constituye aproximadamente el 7% del contenido en carotenoides del tomate (Nguyen y Schwartz, 1999).

El alto contenido en vitaminas C y E y la presencia de carotenos en el tomate convierten a éste en una importante fuente de antioxidantes, sustancias con función protectora de nuestro organismo. La vitamina C interviene en la formación de colágeno, glóbulos rojos, huesos y dientes además de favorecer la absorción del hierro de los alimentos. La vitamina A es esencial para la visión, la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico, mientras que la vitamina B3 actúa en el funcionamiento del sistema digestivo, el buen estado de la piel, en el sistema nervioso y en la conversión de alimentos en energía.

Tabla 2. Contenido de vitaminas de los frutos frescos de tomate (modificado de Davies y Hobson, 1981)


Contenido (μ g/100g peso fresco)	
Vitamina A (β -caroteno)	900-1.271 ui*
Vitamina B1 (tiamina)	50-60
Vitamina B2 (riboflavina)	20-50
Vitamina B5 (ácido pantoténico)	50-750
Vitamina B6 (piridoxina)	80-110
Vitamina B3 (niacina)	500-700
Vitamina B9 (ácido fólico)	6-20
Vitamina B7 (biotina)	1-4
Vitamina C (ácido ascórbico)	25.000-30.000
Vitamina E (α -tocoferol)	40-1.200

ui*: unidades internacionales=0,6 μ g β caroteno

El limitado aporte calórico, el relativamente alto contenido en fibras y la gran cantidad de minerales, vitaminas y compuestos fenólicos hacen del fruto de tomate un excelente “alimento funcional”, importante no sólo por sus características nutricionales sino también por mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades (Dorais *et al.*, 2008).

1.4. Fructificación

La formación del fruto es uno de los procesos del desarrollo más complejos de las plantas. Existen diferentes etapas en ese proceso, el cuajado del fruto es la base del futuro crecimiento y desarrollo. El cuajado o fructificación se entiende como la reanudación del crecimiento del ovario de la flor, pasando de una condición estática a un rápido crecimiento, y depende de una exitosa polinización y fecundación de los óvulos (Gillaspy *et al.*, 1993).

1.4.1. Polinización

Durante la formación de la flor, el estilo se alarga rápidamente, empujando el estigma a través del cono estaminal; el estigma permanece receptivo al polen desde dos días antes hasta dos o seis días más. Durante este periodo se produce la anthesis, las flores se abren y las anteras dehiscen permitiendo la caída de los granos de polen en el estigma (Smith, 1935). Dado que las anteras adyacentes están unidas lateralmente por filas de pelos para formar el cono estaminal, los granos de polen de las anteras adyacentes se liberan al canal común formado por los pelos. Esto permite que el polen de una flor caiga sobre su mismo estigma, autopolinizándose. Si las anteras no se unen para formar el cono estaminal se dificulta la autopolinización (Levy *et al.*, 1978).

La transferencia de los granos de polen al estigma depende también de la longitud del estilo; para que se produzca la autopolinización el estigma debe estar situado a la altura del cono de las anteras o por debajo de él. Para que los granos de polen queden adheridos al estigma, la humedad relativa debe ser entre 60% y 80% y la temperatura tiene que encontrarse entre 17°C y 24°C (Ravestjin, 1970).

1.4.2. Fecundación

Después de la polinización, para que se produzca la fecundación, es necesaria la germinación del polen, la penetración y el crecimiento del tubo polínico en el tejido estilar hacia el óvulo y la penetración en el saco embrionario para la fusión con la ovocélula. El saco embrionario (gametofito femenino) en las angiospermas está

formado por ocho núcleos haploides distribuidos en siete células organizadas con un patrón y una disposición característica. Las tres células que se sitúan en el extremo más cercano al micrópilo son la ovocélula o gameto femenino y las dos sinérgidas que la flanquean. Las tres células que se sitúan en el extremo más alejado del micrópilo son las antípodas. En el centro, ocupando casi todo el volumen del saco embrionario, se sitúa la célula polar que contiene dos núcleos polares que se fusionarán para formar el núcleo secundario diploide (Farabee, 2001). El gametofito masculino está compuesto por dos núcleos: un núcleo vegetativo (que formará el tubo polínico al germinar en el estigma) y un núcleo generativo (que volverá a dividirse originando dos células espermáticas o gametos masculinos). Una vez germina la célula vegetativa se forma el tubo polínico que crece a través del estilo y penetra en el óvulo a través del micrópilo. Mientras esto ocurre, la célula generativa que estaba dentro del grano de polen, sufre un proceso de división que da origen a las dos células espermáticas. Una vez formado el tubo polínico, las dos células espermáticas descienden por el mismo tubo y penetran en el saco embrionario a través de una de las dos sinérgidas, teniendo lugar la rotura del tubo polínico y la liberación de las 2 células espermáticas. Tras la migración de las células espermáticas se produce el proceso de la doble fecundación. Una célula espermática se une con la ovocélula para formar el cigoto a partir del cual se desarrollará el embrión. La otra célula espermática se une al núcleo secundario diploide para formar un núcleo triploide, el núcleo del endospermo, a partir del cual se originará el endospermo que servirá como reserva de nutrientes para el embrión (Farabee, 2001).

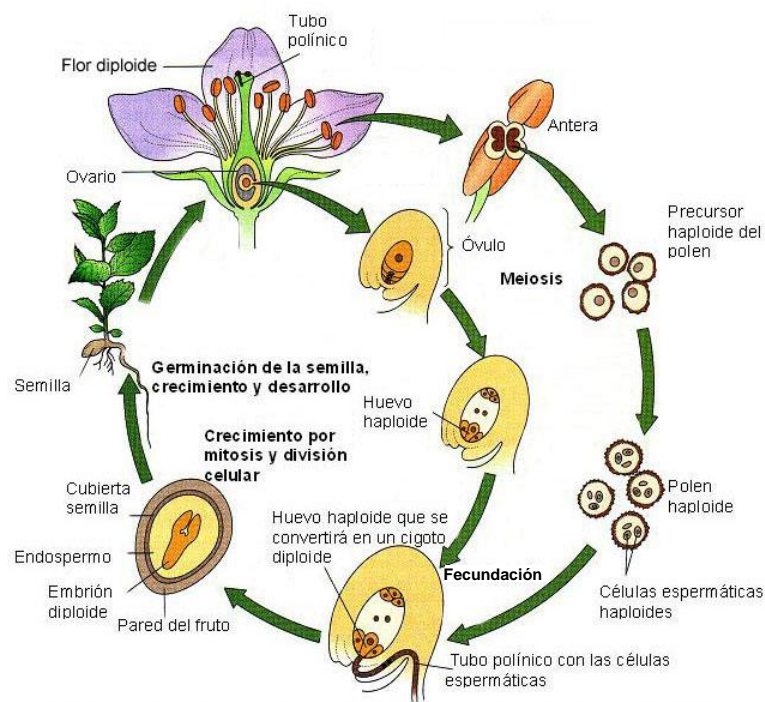


Figura 2. Esquema de los procesos de polinización, fecundación y fructificación dentro del ciclo de vida de una angiosperma. Adaptado de Manset ,1998.

El número de óvulos fecundados, y por consiguiente el número de semillas, dependen del número de células espermáticas que alcancen los óvulos (Ho y Hewitt, 1986). En la Figura 2 se puede ver un esquema de este proceso adaptado por Manset, 1998.

Tanto la polinización como la fecundación dependen de factores ambientales (humedad, temperatura) y de aspectos morfológicos de la flor (Picken, 1984; Ho y Hewitt, 1986).

Generalmente, el desarrollo del fruto sólo se inicia si tiene lugar la polinización y la posterior fecundación del ovario. En tomate, si los óvulos no se fecundan, el desarrollo del ovario se detiene, la flor entra en senescencia y finalmente cae. El ovario sigue creciendo ligeramente pero no llega a alcanzar el tamaño de los frutos polinizados.

1.5. Desarrollo del fruto

El desarrollo del fruto de tomate puede dividirse en 4 fases. La primera fase empieza cuando la flor ha sido polinizada y fecundada; está relacionada con el desarrollo del ovario y la decisión de abortar o continuar con el desarrollo del fruto (cuajado) (Figura 3A). En la segunda fase el crecimiento del fruto ocurre principalmente como consecuencia de intensas divisiones celulares (Figura 3B). Éstas se producen en todos los tejidos del fruto aunque, mayoritariamente en el pericarpo y en el tejido placentario. En las etapas tempranas la actividad mitótica es mayor en la zona exterior del pericarpo que en la interior, y, las células de la columela y de la placenta muestran también alta actividad mitótica. Las semillas en desarrollo pueden controlar y mantener la tasa de divisiones celulares en el tejido locular y la placenta, ya que se ha observado que el número de óvulos fecundados determina la tasa inicial de crecimiento del ovario (Varga y Bruinsma, 1986). También se sabe que existe una correlación entre el número de semillas en desarrollo y el crecimiento del fruto (Gustafson, 1939; Hobson y Davies, 1970; Varga y Bruinsma, 1986).

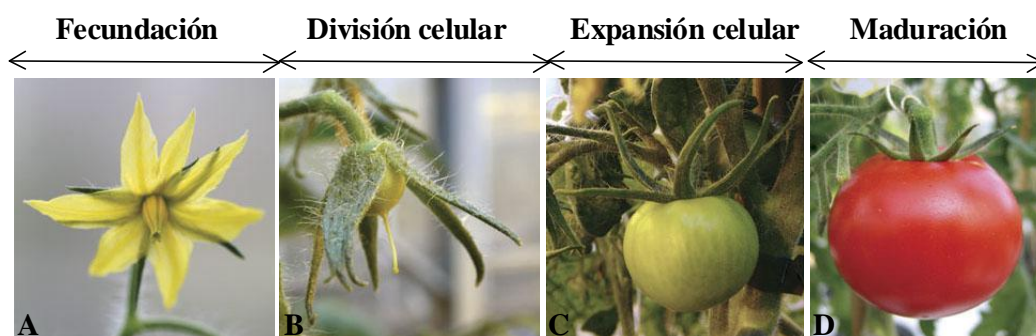


Figura 3. Desarrollo del fruto de tomate. (A) La primera etapa del desarrollo comienza cuando la flor ha sido polinizada y fecundada. (B) Etapa de división celular, se extiende desde los 2-14 días después de la fecundación. (C) La expansión celular dura entre 6-7 semanas. (D) Maduración del fruto. Adaptado de De Jong *et al.*, 2009.

En la tercera fase, cesa la división celular y el fruto continúa el crecimiento a través de la expansión celular hasta que alcanza el tamaño final (Figura 3C). Con la expansión celular el volumen de células de la placenta, del tejido locular y del mesocarpo puede aumentar más de 10 veces, mientras que las células del exocarpo y del endocarpo, que continúan dividiéndose, se expanden menos (Gillaspy *et al.*, 1993). Conforme va engrosando la pared celular primaria, la vacuola ocupa la mayor proporción del volumen final de la célula y comienza a acumularse almidón, ácidos orgánicos y otras sustancias (Chamarro, 1995). Las semillas no crecen en proporción directa al fruto pues no incrementan su tamaño de forma paralela al mismo (Gillaspy *et al.*, 1993). La cuarta y última fase es la maduración (Figura 3D), caracterizada por una elevada variedad de cambios químicos y estructurales que determinan el aroma, color, textura y composición bioquímica final del fruto (Gillaspy *et al.*, 1993). Cada una de estas características organolépticas es producto de modificaciones celulares y bioquímicas diferentes. Por ejemplo, los cambios en el color son debidos a alteraciones en el contenido de clorofila, carotenoides y/o flavonoides; las variaciones en la textura son debidas a alteraciones en la turgencia de las células. Estos cambios son consecuencia de modificaciones en la estructura y/o metabolismo de la pared celular (Giovannoni, 2004). Como resumen de todo lo dicho anteriormente, en el tamaño final del fruto influyen diversos factores como el número inicial de células dentro del ovario antes de la fecundación, el número de divisiones celulares, el número de semillas en desarrollo y la expansión celular (Varga y Bruinsma, 1986; Bohner y Bangerth, 1988; Mapelli *et al.*, 1993).

1.6. Control hormonal de la fructificación

Las hormonas tienen una gran importancia en el desarrollo del fruto. El etileno está implicado en la maduración de los frutos climatéricos, como el tomate, la manzana o el plátano. Las citoquininas se caracterizan por promover la división celular en plantas; en el tomate, la mayor concentración de citoquininas se encuentra en la semilla 5 días después de la anthesis y decrece hasta el comienzo de la maduración (Srivastava y Handa, 2005). El ABA está implicado en las respuestas de las plantas a diversos tipos de estrés; además regula la desecación de las semillas e induce el letargo del embrión para evitar la germinación temprana, cuando la semilla aún está dentro del fruto (Gillaspy *et al.*, 1993). Otros reguladores vegetales implicados en el desarrollo del fruto son las poliaminas, brasinoesteroides y el ácido jasmónico. La aplicación de diversas poliaminas en el ovario de tomate produce frutos partenocárpico (Fos *et al.*, 2000). Los brasinoesteroides están implicados en la regulación de la maduración del fruto y

en la composición final del mismo (Srivastava y Handa, 2005). El ácido jasmónico también está implicado en la maduración del fruto, de forma que su concentración aumenta durante el proceso de maduración (Imanishi y Nagata, 2004).

Durante la fructificación del tomate, las hormonas que desempeñan un papel fundamental son las auxinas y las GAs (Mapelli *et al.*, 1978; Bohner y Bangerth, 1988; Fos *et al.*, 2000; Fos *et al.*, 2001).

1.6.1. Las auxinas y la fructificación en tomate

Las auxinas son reguladores del crecimiento caracterizados por promover la elongación celular cuando se aplican en concentraciones bajas a tejidos vegetales (Cohen *et al.*, 2003). El ácido indolacético (IAA) es la auxina más importante y la de mayor presencia en plantas. Se sintetiza principalmente en los tejidos jóvenes (primordios de las hojas, en las hojas jóvenes, frutos jóvenes y en las semillas en desarrollo) y se transporta hasta la raíz. Los niveles de IAA libre en el citosol están regulados en los tejidos de la planta de una manera precisa mediante una serie de mecanismos: síntesis *de novo*, síntesis o hidrólisis de los conjugados, transporte de un lugar de la planta a otro y degradación mediante catabolismo oxidativo (Srivastava, 2002; Bandurski *et al.*, 1995).

La biosíntesis de IAA puede llevarse a cabo a partir de rutas donde el precursor es el triptófano (ruta del ácido indolpirúvico, ruta de la triptamina y ruta de la indolacetoxina) y de una ruta alternativa independiente del triptófano, en la que el precursor es el corismato. Los diferentes tipos de auxinas se encuentran en plantas como ácidos libres o como formas conjugadas. La mayoría del IAA en las plantas se encuentra en forma conjugada con compuestos tales como proteínas, aminoácidos y azúcares. Los dos tipos más comunes de conjugados son los derivados tipo éster y los derivados tipo amida (Normanly *et al.*, 2004). La función de los conjugados es almacenar, transportar y compartimentalizar auxinas, proteger frente a la degradación enzimática y controlar homeostáticamente la concentración de IAA en las plantas (Cohen *et al.*, 1982).

La distribución de las auxinas en las plantas se produce a través de dos tipos de transporte distintos, un transporte rápido (no polar) a través del floema y un transporte Polar, PAT (Polar Auxin Transport), más lento (célula-célula), en varios tejidos. El PAT ocurre principalmente a través de los transportadores polares de entrada de auxinas pertenecientes a la familia AUX1, y a los transportadores de salida pertenecientes a la familia PIN (Bennett *et al.*, 1996; Gälweiler *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998). El PAT es necesario para la formación y el mantenimiento de gradientes locales de distribución de auxinas, muy importantes en procesos de organogénesis, desarrollo de

patrones y respuestas diferenciales de crecimiento de las plantas (revisado en Tanaka *et al.*, 2006).

El catabolismo oxidativo del IAA es una modificación química del núcleo indol que da lugar a la pérdida de actividad auxínica. Estudios sobre el catabolismo del IAA indican que esta hormona se encuentra ubicuamente en la planta, que diversos enzimas tipo peroxidasa catalizan la descarboxilación oxidativa del IAA, y que no hay una ruta predominante de catabolismo (Normanly *et al.*, 2004).

El mecanismo molecular que funciona en la señalización por auxinas (Figura 4) se conoce con más detalle que su síntesis: las auxinas regulan la expresión de genes diana mediante la degradación de las proteínas Aux/IAA, que son proteínas nucleares de vida corta. Las auxinas promueven la ubiquitinación de estas proteínas de respuesta a auxinas Aux/IAA por el complejo SCF (Skp1/Cullin/F-box), lo que conduce a su degradación por el proteosoma 26S. Así se elimina el efecto represor de los complejos Aux/IAA sobre los factores de transcripción de respuesta a auxinas ARF (Auxin Response Factors), y se permite la transcripción de genes diana de las auxinas. El mecanismo por el que las auxinas promueven la interacción SCF– Aux/IAA es la unión directa de IAA al receptor de auxinas (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinsky y Leyser 2005; Bishop *et al.*, 2006).

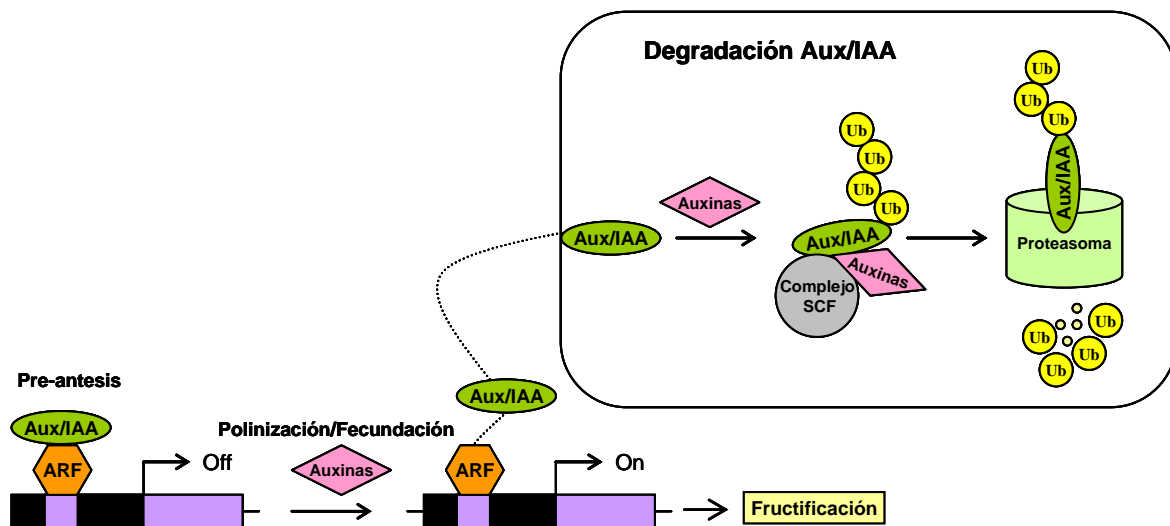


Figura 4. Mecanismo molecular de acción de las auxinas. En el ovario en pre-anteses las proteínas reguladoras (Aux/IAA) forman heterodímeros con los factores de respuesta a auxinas (ARF), reprimiendo la señalización mediante auxinas y el crecimiento del ovario. La fecundación de los óvulos produce un aumento de la concentración de auxinas. Las auxinas se unen a las Aux/IAA, e interaccionan con el complejo SCF, de manera que se promueve la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA, marcándolas para su destrucción en el proteosoma 26S y eliminando la inhibición de las proteínas ARF. Adaptado de Pandolfini *et al.*, 2007.

Diversos estudios han demostrado la importancia de las auxinas en la fructificación y en el desarrollo del fruto de tomate. La aplicación exógena de auxinas antes de la polinización puede conducir al desarrollo partenocárpico (Gustafson, 1936; Nitsch, 1970; Bünger-Kliber y Bangerth, 1982/83; Alabadí *et al.*, 1996). De la misma manera, tratamientos con inhibidores del transporte polar de auxinas son capaces de provocar partenocarpia. Se ha propuesto que la capacidad de los inhibidores del transporte polar de auxinas se debe a que las auxinas sintetizadas en el ovario quedan bloqueadas y su acumulación conduce al desarrollo del mismo (Robinson, 1971; Beyer y Quebedeaux 1974). En tomate, berenjena, fresa frambuesa y pepino, la expresión en el ovario y los óvulos de genes de biosíntesis de auxinas también provoca partenocarpia (Rotino *et al.*, 1997; Ficcandeti *et al.*, 1999; Pandolfini *et al.*, 2002; Mezzetti *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2006). De la misma manera la expresión en tomate del gen *rolB* de *Agrobacterium rhizogenes* imita, mediante un mecanismo desconocido, algunos efectos provocados por las auxinas, sin alterar su metabolismo (Carmi *et al.*, 2003; Shabtai *et al.*, 2007). Diversos autores han propuesto a varios elementos de señalización por auxinas (IAA9, ARF7, ARF8) como represores de la fructificación al formar parte de un complejo con proteínas Aux/IAA que inhibe la transcripción de genes responsables del inicio de la fructificación. Así pues, líneas transgénicas en las que se silencian los genes *S/IAA9* ó *SIARF7* tienen la capacidad de desarrollarse partenocárpicamente (Wang *et al.*, 2005; De Jong *et al.*, 2009). El factor transcripcional ARF8 interactúa con proteínas Aux/IAA e inhibe el desarrollo del fruto hasta que la fecundación tiene lugar (Goetz *et al.*, 2006).

1.6.2. Las giberelinas y la fructificación en tomate

Las giberelinas (GAs) son ácidos diterpeno tetracíclicos, cuya estructura básica está constituida por un anillo *ent*-giberelano, algunos de los cuales tienen actividad hormonal (Talón, 2000). Las GAs pueden actuar como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas, la inducción de flores y el desarrollo de frutos (Pharis y King 1985; Huttly y Phillips, 1995; Sponsel, 1995; Hedden y Kamiya, 1997).

La biosíntesis de GAs sucede a través de diferentes pasos catalizados por enzimas de distinta localización subcelular (Figura 5). A pesar de su complejidad, la ruta se puede dividir en tres fases: la biosíntesis de *ent*-kaureno en los proplastidios a partir de geranilgeranilpifosfato (GGPP), conversión de *ent*-kaureno a GA₁₂ en el retículo

endoplasmático y síntesis de GAs activas en el citoplasma a partir de GA_{12} (Hedden y Phillips, 2000a; Olszewski *et al.*, 2002). Se han identificado numerosas GAs en plantas superiores, hongos y bacterias, pero sólo unas pocas son biológicamente activas (GA_1 , GA_3 , GA_4 y GA_7). Las demás son mayoritariamente intermediarios de la ruta o productos del catabolismo.

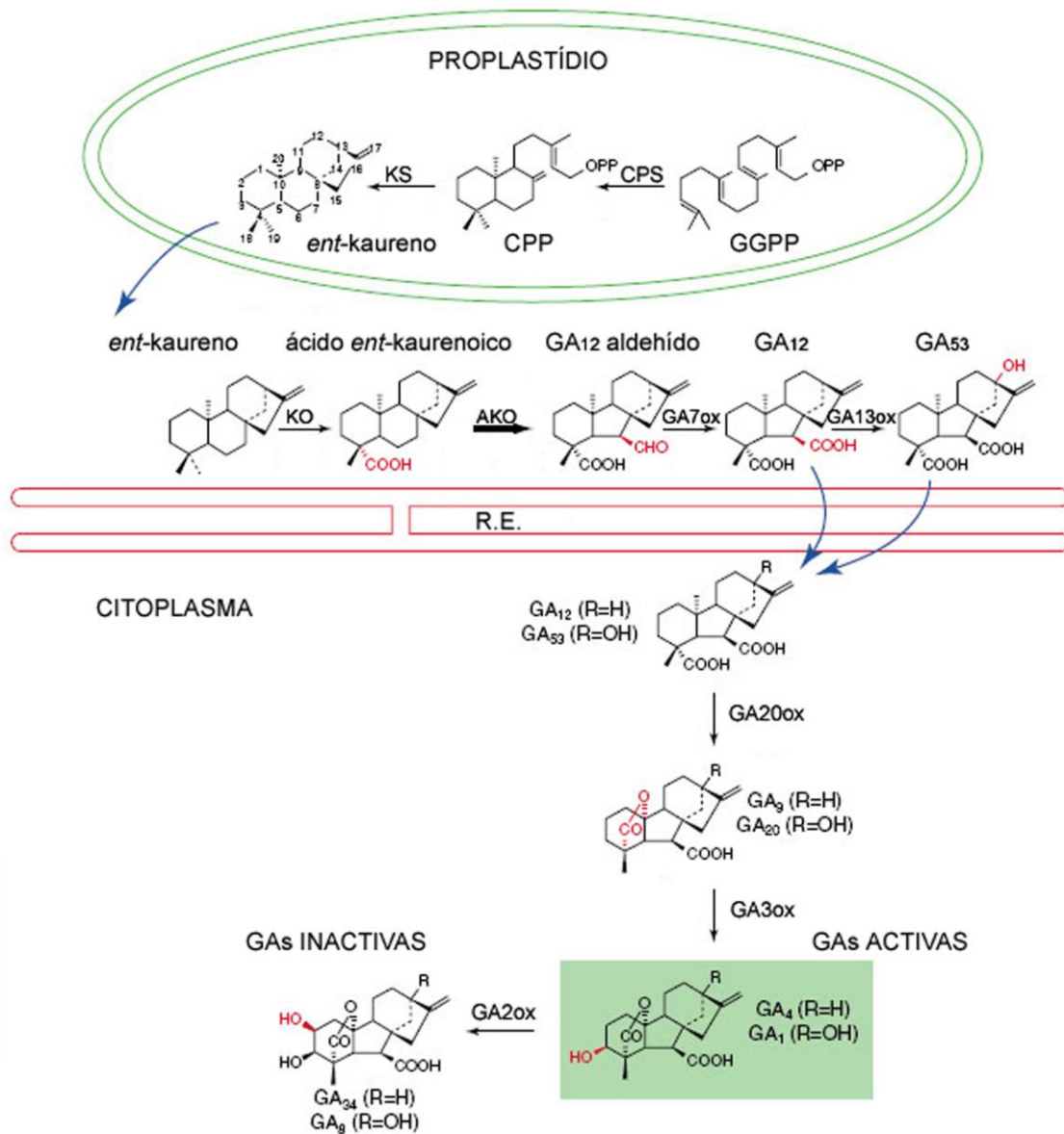


Figura 5. Esquema general del metabolismo de las GAs y su compartimentalización subcelular. El *ent*-kaureno se sintetiza por enzimas solubles localizadas en el proplastidio y, posteriormente se convierte, por enzimas asociadas al retículo endoplasmático (R.E.), a GA_{12} . La oxidación de GA_{12} mediante enzimas solubles de localización citoplasmática da lugar a la formación de GAs activas e inactivas. Los grupos funcionales introducidos o modificados en cada paso de la ruta se indican en rojo y las GAs activas se muestran sobre fondo verde. GGPP: geranylgeranyl pirofosfato, CPS: *ent*-copalil bifosfato sintasa, CPP: copalil pirofosfato, KS: *ent*-kaureno sintasa, KO: *ent*-kaureno; AKO: ácido *ent*-kaurenóico sintasa, GA7ox: GA7oxidasa, GA13ox: GA 13-oxidasa, GA20ox: GA 20-oxidasa, GA3ox: GA 3 β -hidroxilasa, GA2ox: GA 2-oxidasa. Adaptado de Hedden y Phillips, 2000a.

Los últimos pasos de la ruta de biosíntesis consisten en oxidaciones sucesivas catalizadas por las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato GA20 oxidasas (GA20ox) y GA3 oxidasas (GA3ox), que darán lugar a GA₁ y GA₄. Las GA2 oxidasas (GA2ox) catalizan la 2β-hidroxilación que convierte a estas GAs en las formas inactivas GA₈ y GA₃₄, respectivamente. La cantidad de GAs bioactivas se pueden modular regulando la velocidad de su síntesis y de su degradación. Este balance, además, está regulado por mecanismos de retroalimentación negativa y positiva: la expresión de las GA20ox y GA3ox es regulada negativamente por GAs, mientras que la expresión de las GA2ox es inducida por GAs (Hedden y Phillips, 2000a; Olszewski *et al.*, 2002).

En tomate, las GA20ox están codificadas por 3 genes (*SIGA20ox1*, *SIGA20ox2* y *SIGA20ox3*), las GA3ox están codificadas por 2 genes (*SIGA3ox1* y *SIGA3ox2*) y las GA2ox están codificadas por 5 genes (*SIGA2ox1*, *SIGA2ox2*, *SIGA2ox3*, *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5*) (Rebers *et al.*, 1999; Serrani *et al.*, 2007b). Los genes que codifican las *SIGA20ox* tienen un patrón de expresión distinto tanto a nivel vegetativo como reproductivo, expresándose de forma diferencial en las distintas etapas del desarrollo de las yemas florales (Rebers *et al.*, 1999). *SIGA20ox1* se expresa en tallos y hojas pero no en raíces; en los tejidos reproductivos se expresa en yemas florales y en frutos que se encuentran en los primeros estadios de desarrollo. *SIGA20ox2* se expresa a niveles basales en hojas, tallos y raíces mientras que, a nivel reproductivo, se expresa en yemas florales y, a muy bajos niveles, en los primeros estadios del desarrollo del fruto. Serrani *et al.*, 2007b describen que los transcritos de los genes *SIGA20ox1* y *SIGA20ox2* son prácticamente indetectables en ovarios no polinizados expresándose en ovarios polinizados. Estos resultados sugieren que la actividad GA20ox se altera con la polinización (Serrani *et al.*, 2007b).

La expresión de *SIGA20ox3* se detecta en raíces y frutos inmaduros, mientras que en yemas florales apenas se detecta (Rebers *et al.*, 1999). El gen *SIGA3ox1* se expresa en ovarios polinizados y no polinizados, permaneciendo sus niveles relativamente constantes hasta los primeros estadios del desarrollo del fruto (Serrani *et al.*, 2007b). El gen *SIGA3ox2* se expresa débilmente, comparado con *SIGA3ox1*, tanto en ovarios polinizados como no polinizados (Serrani *et al.*, 2007b). Estos resultados sugieren que la actividad GA3ox (representada por *SIGA3ox1*) está presente en los ovarios no polinizados y que la polinización no altera dicha actividad.

Los genes que codifican las enzimas encargadas de la inactivación de las giberelinas activas, GA2ox, se han identificado en distintas especies observándose, en cada una de ellas, un patrón de expresión diferencial para cada gen que

conforma la familia. En tomate, los niveles de transcritos de los cinco genes aislados de *SIGA2ox* se analizaron en diferentes tejidos (raíz, hoja, flor completa, ovarios, estambres, pétalos, sépalos y frutos en desarrollo), observándose que su expresión está regulada a lo largo del desarrollo (Serrani *et al.*, 2007b). Todos ellos se expresaron en ovarios no polinizados en el momento de la antesis y en las etapas tempranas del desarrollo del fruto; sin embargo, no hay una disminución en la expresión de ovarios polinizados después de la antesis, cuando el desarrollo ya está en curso. Esto significa que el efecto de la polinización en el desarrollo temprano del fruto no parece estar mediado por un efecto en la inactivación de GAs a través de *GA2ox* (Serrani *et al.*, 2007b).

La cascada de señales que se desencadenan tras la percepción de GAs se conoce menos que su biosíntesis, aunque sistemas como la aleurona de los cereales y los mutantes de respuesta a GAs en *Arabidopsis* y arroz han permitido avanzar en el conocimiento del proceso de señalización (Olszewski *et al.*, 2002). La señalización por GAs se basa en la degradación de proteínas. El descubrimiento de la función de las proteínas DELLA en la señalización de GAs muestra que el mecanismo de esta cadena es común con el de otras vías de señalización tanto de hormonas (auxinas, etileno o jasmonato) como de otros estímulos, entre los que se encuentra la luz. La degradación de las proteínas DELLA se lleva a cabo mediante su ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma 26S, actuando como reguladores negativos de la respuesta a GAs (Sun y Gubler 2004). En esta vía tiene una gran importancia el complejo enzimático SCF (Skp1/cullin/F-box) E3 ubiquitina ligasa cuya subunidad F-box posee un dominio C-terminal que confiere la especificidad de unión al sustrato que se debe ubiquitinar (Thomas y Sun, 2004). Las proteínas DELLA pertenecen a una familia de factores de transcripción, la familia GRAS (GAI-RGA y Scarecrow) (Pysh *et al.*, 1999). La estructura de las proteínas DELLA posee dos dominios. El del extremo C-terminal, denominado dominio GRAS, importante para la función de la proteína y común a todas las proteínas que pertenecen a la familia GRAS, y el del extremo N-terminal, denominado DELLA, importante para la regulación por GAs (Thomas *et al.*, 2005). En *Arabidopsis* se han identificado cinco genes *DELLA*, en contraste con arroz, cebada ó tomate, especies en las que la familia DELLA tiene un solo miembro. Existen proteínas que regulan la actividad de las proteínas DELLA ejerciendo una regulación positiva, si disminuyen la estabilidad de las DELLA para ser degradadas, ó negativa, si aumentan su estabilidad frente a la degradación. Entre los reguladores negativos se encuentra el gen *SPINDLY* (*SPY*) de *Arabidopsis* que, supuestamente modifica, activa y estabiliza a las proteínas DELLA evitando su degradación por ubiquitinación (Jacobsen y Olszewski 1993, Silverstone *et al.*, 2006). Por ello el fenotipo de los

mutantes *spy* es como el de las plantas tratadas exógenamente con niveles saturantes de GAs.

Existen diversas evidencias que han demostrado la importancia de las GAs en la fructificación y en el desarrollo del fruto de tomate. En primer lugar, la aplicación exógena de GAs antes de la polinización puede conducir al desarrollo de frutos partenocárpicos en numerosas especies como guisante (García-Martínez *et al.*, 1997), *Arabidopsis* (Vivian-Smith y Koltunow, 1999) y tomate (Fos *et al.*, 2000). De manera inversa, la aplicación exógena de paclobutrazol, un inhibidor de la biosíntesis de GAs, impide el desarrollo del ovario, efecto que es revertido por la aplicación exógena de GA₃ (Fos *et al.*, 2000). Otra observación que respalda la importancia de las GAs en el cuajado y desarrollo del fruto es la incapacidad de los ovarios no polinizados de cuajar y desarrollarse sin la aplicación exógena de GA₃ (Fos *et al.*, 2000). También se ha descrito que genes que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de GAs, se expresan durante el desarrollo de la flor y del fruto (Rebers *et al.*, 1999). Finalmente, plantas transgénicas de tomate en las que se silencia el gen *SIDELLA* (que codifica proteínas cuya degradación es inducida por GAs) presentan partenocarpia facultativa, reforzando así la idea de que la proteína *SIDELLA* actúe como represor de la fructificación (Martí *et al.*, 2007).

Desde hace mucho tiempo se ha sugerido que el desarrollo del fruto después de la fecundación sería impulsado por las hormonas sintetizadas en tejidos como el pericarpo y las semillas en desarrollo (Gustafson, 1939; Nitsch, 1950; Ozga *et al.*, 2003). Además se ha comprobado cuantitativamente que esa síntesis de fitohormonas tiene lugar (Sponsel, 1983; García-Martínez *et al.*, 1991; Rodrigo *et al.*, 1997). Esto promueve el cuajado del fruto y el crecimiento de las semillas y del pericarpo. A su vez, las semillas mantienen el crecimiento del pericarpo, al menos en parte, dirigiendo el transporte de auxinas hacia ese tejido, donde se estimula la síntesis de GAs hasta niveles adecuados para su crecimiento (Ozga *et al.*, 2003). Aunque se tienen evidencias de que las auxinas tienen otros efectos independientes de GAs en el desarrollo del fruto de tomate (Van Huizen *et al.*, 1997), la interacción entre auxinas y GAs es necesaria para la coordinación del desarrollo del fruto y de las semillas (Ozga *et al.*, 2003).

2. Partenocarpia en tomate

La partenocarpia es una vía alternativa al cuajado y desarrollo normal del fruto y consiste en el desarrollo del ovario sin la formación de semillas. La partenocarpia puede ocurrir cuando no se produce la fecundación, cuando hay polinización pero no fecundación o, cuando ocurren ambos procesos pero abortan las semillas (Gillaspy *et al.*, 1993). En tomate, el empleo de parentales que producen frutos partenocárpicos ha sido una de las soluciones al problema del cuajado a bajas temperaturas en condiciones de cultivo de invierno-primavera, lo que ha permitido la expansión del cultivo fuera de temporada.

2.1. Tipos y fuentes de partenocarpia

La producción de frutos partenocárpicos en tomate se puede inducir de forma artificial ó ser producida de forma natural. La partenocarpia se puede inducir artificialmente mediante la aplicación de extractos de polen, polen muerto o sustancias químicas, como reguladores del crecimiento, aplicadas a los ovarios (Bangerth y Sjut, 1978; Ho y Hewitt, 1986). La partenocarpia natural se produce por causas genéticas, y puede ser obligada o facultativa, dependiendo de las condiciones ambientales (Ho y Hewitt, 1986). La partenocarpia obligada está asociada a la esterilidad genética y las plantas que la poseen requieren métodos vegetativos de propagación. La partenocarpia facultativa tiene lugar en aquellas especies en las que el proceso de polinización y fecundación depende de las condiciones ambientales.

Se han descrito numerosos parentales con mayor o menor capacidad para cuajar frutos partenocárpicos de forma natural (George *et al.*, 1984; Lukyanenko, 1991)(Tabla 3). Diversos estudios realizados para determinar el grado de expresión de la partenocarpia de diferentes cultivares se puede concluir que, el cultivar italiano "Soressi o Montfavet 191", el cultivar ruso "Severianin" y la línea alemana "RP 75/59" son los materiales con mayor expresión del carácter y, por tanto, los que presentan mayor potencialidad en la mejora genética como solución al problema del cuajado de frutos a bajas temperaturas.

Tabla 3. Fuentes potenciales de partenocarpia en tomate.

Cultivar/Líneas	País de origen	Control genético	Referencia
PI 190256	Nueva Caledonia	desconocido	Johnson y Hall, 1954
Stock 2524	Italia	<i>pat</i> ^a	Soressi, 1970
Oregon Cherry	USA	desconocido	Baggett y Fraizer, 1978
Oregon 11	USA	desconocido	Baggett y Fraizer, 1978
Montfavet 191	Francia	<i>pat</i>	Pecaut y Philouze, 1978
Severianin	Rusia	<i>pat-2</i>	Philouze y Maisonneuve, 1978; Nuez <i>et al.</i> , 1986
PSET 1	USA	<i>pat-2</i>	Scott y George, 1984
Carobeta	Bulgaria	un gen recesivo	Georgiev y Mikhailov, 1985
IVT 1	Holanda	un gen recesivo	Zijlstra, 1985
RP 75/59	Alemania	<i>pat-3/pat-4</i>	Nuez <i>et al.</i> , 1986
Sub Artic Plenty	Canadá	<i>pat-5</i>	Nuez <i>et al.</i> , 1987
Oregon T5-4	USA	dos genes recesivos	Kean y Baggett, 1986
Oregon Spring y Santiam	USA	<i>pat-2</i>	Baggett y Kean, 1986
Oregon Pride y Oregon Star	USA	<i>pat-2</i>	Baggett <i>et al.</i> , 1995
Siletz	USA	<i>pat-2</i>	Baggett <i>et al.</i> , 1997
Nadja	Egipto	un gen recesivo	Mohamed, 1998

^aLa mutación *pat*, es el primer gen de partenocarpia descrito en tomate (Bianchi y Soressi, 1969) y más tarde se ha descrito que va asociada a alteraciones en el desarrollo de la flor (Mazzucato *et al.*, 1998; Mazzucato *et al.*, 1999).

El mutante “Soressi o Montfavet 191” surgió tras el tratamiento de semillas de la variedad Roma con EMS, (Bianchi y Soressi, 1969; Soressi, 1970). Este mutante presenta anteras cortas (controlado por el gen recesivo *sha*) y, ligado a él observaron otro gen recesivo, responsable del desarrollo del ovario sin polinización y al que denominaron *pat*. Este mutante, denominado *pat*, muestra un síndrome complejo que afecta a diferentes aspectos del desarrollo de flores y frutos. Presenta estambres con un tamaño reducido transformados en órganos carpeloides y, en las anteras con un fenotipo severo de malformación, la hipertrofia del *tapetum* provoca la degeneración del tejido esporofítico, inhibiéndose la producción de granos de polen (Mazzucato *et al.*, 1998). Además el crecimiento del ovario comienza precozmente, en estadio de pre-antesis y sus óvulos son inviables (Mazzucato *et al.*, 1998). La partenocarpia del mutante *pat* se expresa bien en cualquier época del año sin necesidad de castración o de condiciones precisas del cultivo, siendo muy difícil obtener semillas de este material vegetal (Pecaut y Philouze, 1978).

El cultivar ruso “Severianin” procede del cruce interespecífico entre *L. esculentum* y *L. hirsutum* (Philouze, 1983). Diversos autores han descrito que una mutación recesiva en el gen *pat-2* es la responsable de la partenocarpia en “Severianin” (Maisonneuve, 1978; Nuez *et al.*, 1984). Este cultivar produce frutos partenocárpicos de tamaño y aspecto similar a los frutos con semillas cuando las condiciones de cultivo son desfavorables para la producción del polen y la subsiguiente fecundación (George *et al.*, 1984; Lukyanenko, 1991). Por el contrario, cuando las condiciones ambientales

permiten el desarrollo normal de dichos procesos, los frutos cuajados presentan semillas. En general las plantas que producen los frutos partenocárpicos del cv. "Severianin" no presentan alterados otros caracteres del desarrollo reproductivo, siendo la morfología de los óvulos y la producción de gametos, con frecuencia, normal (Lin *et al.*, 1984; Asahira *et al.*, 1967). Philouze y Maisonneuve, 1978 han descrito que el gen *pat-2* no es alélico del gen *pat*, responsable de la partenocarpia en el mutante *pat*. La línea alemana "RP 75/59" posee polen viable (Preil y Reimann-Philipp, 1969) y su capacidad para cuajar frutos partenocárpicos es dependiente de las bajas temperaturas. Philouze y Maisonneuve, 1978, propusieron que la expresión de la partenocarpia natural en esta línea está controlada por al menos tres genes recesivos no alélicos a los descritos anteriormente (*pat* y *pat-2*). Por el contrario, Nuez *et al.*, 1984, proponen que el sistema genético responsable de la partenocarpia natural de la línea "RP 75/59" está constituido por dos genes recesivos, no alélicos de los ya descritos, a los que denominaron *pat-3/pat-4*. Uno sólo de estos genes, aún en homocigosis, no sería capaz de producir partenocarpia, necesitándose al menos uno de ellos en homocigosis y el otro en heterocigosis para que se manifieste el carácter. Este sistema genético ha sido confirmado con posterioridad en ensayos realizados con distintos materiales y en fondos genéticos distintos (Nuez *et al.*, 1986; Nuez *et al.*, 1987; Nuez *et al.*, 1988). Los mutantes partenocárpicos *pat*, *pat-2* y *pat-3/pat-4* muestran un aumento en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de GAs, esto hace que aumenten los niveles de GAs activas y éstas inducen la formación de frutos partenocárpicos (Fos *et al.*, 2000; Fos *et al.*, 2001; Olimpieri *et al.*, 2007). También se ha identificado el gen "*pat-5*", responsable de la partenocarpia en la línea "Subartic Plenty" de Canadá (Nuez *et al.*, 1996).

2.2. Relación entre los genes homeóticos florales y la partenocarpia

La mayoría de los genes que codifican la identidad de órganos florales codifican factores transcripcionales pertenecientes a la familia MADS-box. Las proteínas de esta familia se caracterizan por presentar un dominio altamente conservado en el extremo N-terminal, la caja MADS. Esta característica ha sido utilizada para aislar genes MADS-box en distintas especies. En tomate se han aislado y caracterizado varios genes MADS-box de expresión específica en flores; la función de algunos de ellos ha sido investigada por técnicas de cosupresión y expresión antisentido en plantas transgénicas (Pnueli *et al.*, 1991; Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002).

El gen MADS-box de tomate *TM29* presenta homología de secuencia con los genes *SEP* de *Arabidopsis thaliana*. Su expresión se observa uniformemente en el

meristemo floral en aquellas células que darán lugar a los cuatro primordios florales (Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002). Posteriormente, una vez diferenciados los primordios de los órganos florales, la expresión de *TM29* desaparece de los órganos del perianto y se restringe a los órganos reproductivos (estambres y carpelo). Las plantas transgénicas que expresaban este gen en orientación antisentido mostraron conversiones homeóticas de pétalos y estambres a sépalo, fenotipo similar al que presenta el triple mutante *sep1 sep2 sep3* (Pelaz *et al.*, 2000). La anulación de la función de este gen afectó la fertilidad masculina y femenina y produjo el desarrollo partenocárpico del fruto (Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002).

El gen MADS-box de tomate *TM5*, homólogo al gen *SEP3* de *Arabidopsis thaliana*, se expresa en los primordios de pétalos, estambres y carpelo de las flores de tomate (Pnueli *et al.*, 1991). En los estambres, el transcrito de *TM5* se detectó en las células arquesporiales y posteriormente en las células esporógenas. En el carpelo, el RNA mensajero de *TM5* se detectó en los óvulos. Los estambres de las plantas transgénicas donde se inhibía la expresión de este gen no formaban el típico cono estaminal alrededor del estilo. Éstos estaban separados y ocupaban las posiciones de los pétalos y los sépalos. En el interior de las anteras, los sacos polínicos estaban colapsados y no desarrollaron granos de polen. La fertilidad femenina también se vio afectada. Además, las flores transgénicas desarrollaron frecuentemente frutos partenocárpicos (Pnueli *et al.*, 1994).

Otro gen de tomate homólogo a los genes *SEP*, el gen *TM8*, se expresa en estadios tempranos del desarrollo de pétalos, estambres y carpelos (Pnueli *et al.*, 1991). Su expresión antisentido, aparte de producir alteraciones morfológicas y cambios de identidad en los órganos florales, esterilidad masculina y femenina de las plantas, provocando el desarrollo partenocárpico del fruto (Lifschit *et al.*, 1993).

Se ha descrito que las bajas temperaturas conducen a un aumento en los niveles de transcritos de los genes *TM4*, *TM5*, *TM6* y *TAG1* y que estos cambios podrían estar asociados a las malformaciones observadas en los órganos florales de plantas de tomate sometidas a este tipo de estrés (Lozano *et al.*, 1998).

El gen *STAMENLESS (SL)* es un gen de clase B homólogo a *DEFICIENS (DEF)* en *Antirrhinum majus* y *APETALA 3 (AP3)* en *Arabidopsis thaliana*, están relacionados con el desarrollo de pétalos y estambres. El mutante de tomate *stamenless* presenta los pétalos de sus flores convertidos parcialmente en sépalos y los estambres se fusionan al carpelo. Independientemente de mostrar conversiones homeóticas similares a las que presentan los mutantes de pérdida de función B, *def* y *glo* (en *Antirrhinum majus*) y *ap3* y *pi* (en *Arabidopsis thaliana*), se ha observado que los frutos formados por este mutante carecen de semillas (Gómez *et al.*, 1999).

El gen *AGAMOUS1* de tomate (*TAG1*), un ortólogo del gen *AGAMOUS* (*AG*) de *Arabidopsis thaliana*, restringe su expresión a los estambres y al carpelo. La función de *TAG1* ha sido estudiada por su expresión en antisentido en plantas transgénicas. Las plantas transgénicas obtenidas produjeron flores con alteraciones homeóticas; los estambres se transformaron en órganos petaloides (Pnueli *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1998). La asociación de transformaciones homeóticas con el desarrollo de frutos partenocárpicos no se ha observado sólo en tomate. Así, la mutación del gen de manzano *MdPI*, homólogo al gen *PISTILLATA* (*PI*) de *Arabidopsis thaliana*, provocó la transformación de pétalos en sépalos y de estambres en carpelos y además la producción de frutos partenocárpicos (Yao *et al.*, 2001).

Todos estos resultados sugieren la posibilidad de que en estas especies los genes que intervienen en la identidad y desarrollo de los órganos florales también puedan tener otras funciones que afecten a procesos posteriores tales como el desarrollo autónomo del ovario (Mazzucato *et al.*, 1998).

2.3. La androesterilidad y la partenocarpia

2.3.1. Definición y tipos de androesterilidad

La androesterilidad es un carácter consistente en el desarrollo anormal del gametofito masculino; este hecho impide la formación de polen o afecta a su fertilidad. Las plantas androestériles se utilizan como parentales femeninos en los programas de mejora. Éstas deben ser completamente estériles masculinas, pero la morfología de los órganos reproductores femeninos debe permanecer sin defectos para que, aunque estas flores no puedan ser autopolinizadas, puedan cruzarse con otras fuentes de polen. En plantas autógamas la producción de híbridos a nivel comercial es difícil; el uso de la androesterilidad, permite a los fitomejoradores eliminar el tedioso proceso de la emasculación en estas especies autógamas.

El carácter de androesterilidad debe ser recesivo, puesto que no es deseable en la generación híbrida de plantas F1, donde tanto las semillas como los frutos son considerados productos (maíz, cebada, arroz o tomate) (Gorman y McCormick, 1997).

En función del control génico de la androesterilidad, se han descrito tres tipos:

1. Androesterilidad genética o nuclear (Nuclear male-sterility, NMS): se produce mediante la acción de genes nucleares que inhiben el desarrollo normal de las anteras y el polen. Esta androesterilidad se ha encontrado en varias especies y está controlada por el gen recesivo (*ms*), mientras que el gen dominante (*Ms*), produce

plantas con anteras y polen normales. Las plantas con el genotipo (*ms ms*), son androestériles, mientras que las (*Ms ms* ó *Ms Ms*) son fértiles. Como las plantas androestériles no se pueden mantener por sí mismas deben ser polinizadas por plantas fértiles que lleven, por lo menos, un gen dominante (*Ms ms*) (Palomares, 1999).

2. Androesterilidad citoplásmica (cytoplasmic male sterility, CMS): Esta clase de esterilidad masculina está controlada por factores citoplasmáticos y se hereda exclusivamente por vía materna. Existen dos tipos básicos de citoplasma: uno normal que produce fertilidad masculina (F) y otro que induce androesterilidad (S). En este tipo de androesterilidad sólo se presentan en la población genes nucleares recesivos (*ms*). El resultado del cruzamiento entre una planta androestéril, que posee un citoplasma estéril (S) y genes homocigóticos recesivos en el núcleo y una planta de citoplasma fértil (F) y núcleo con genes recesivos para la fertilidad, es la producción de plantas que producen semillas y mantienen su esterilidad masculina (Palomares, 1999).

3. Androesterilidad génico-citoplásmica: Es una interacción entre genes recesivos nucleares y citoplasmáticos. Existen los dos tipos de citoplasma básicos descritos para la androesterilidad citoplásmica: (S) que produce esterilidad masculina en presencia de ciertos genes nucleares y (F), que siempre produce fertilidad masculina, independientemente de los genes del núcleo. Se tienen pues las siguientes combinaciones:

Citoplasma	Núcleo	Fenotipo
(S)	<i>ms ms</i>	Androestéril
(S)	<i>Ms</i> __	Fértil
(F)	__ __	Fértil

Este tipo de androesterilidad se diferencia de la de tipo citoplasmático en que la progenie de las plantas androestériles no es necesariamente androestéril, sino fértil cuando se utilizan plantas fértiles que aporten genes nucleares dominantes que suprimen la mutación mitocondrial (*Ms*). La progenie F1 será híbrida y fértil, aunque las células contengan un citoplasma androestéril (Hanson y Conde, 1985). La restauración de la fertilidad mediante este sistema se está utilizando comercialmente en especies de interés agronómico para producir cultivares de semillas híbridas.

Desde el punto de vista fenotípico, las plantas androestériles de tomate pueden mostrar tres tipos de anomalías fenotípicas (Figura 6):

1. Androesterilidad estructural: se producen anomalías en la estructura de los órganos sexuales masculinos; en ocasiones los órganos masculinos son inexistentes. A menudo, la deformación en los estambres conlleva que el polen no se forme. El mutante estructural *stamenless* (*sl*) pertenece a este grupo (Bishop, 1954; Hafen y Stevenson, 1958) (Figura 6A).

2. Androesterilidad esporógena: los estambres se forman de manera normal pero no hay polen o éste aborta en los diferentes estadios de desarrollo del mismo. Los mutantes *male sterile* (*ms*) pertenecen a este grupo y se muestran en la Figura 6B (Rick, 1948).

3. Androesterilidad funcional: los granos de polen son normales y funcionales pero, el desarrollo del fruto no se produce porque existen barreras que impiden la polinización y/o fecundación del ovario (indehiscencia de las anteras, incapacidad del polen para viajar hasta el estigma, etc). A este grupo pertenecen los mutantes *positional sterile* (*ps*) (Larson y Paur, 1948) y *positional sterile-2* (*ps2*) (Tronickova, 1962), ambos con anteras indehiscentes. También pertenecen a este grupo los mutantes *exertos* (*ex*) que presentan un estilo largo que emerge por encima del cono estaminal dejando al estigma fuera del mismo (Figura 6C) (Rick y Robinson, 1951).



Figura 6. Fenotipos de androesterilidad en tomate. (A) Flor correspondiente al mutante *stamenless* (*sl*), mutante con androesterilidad estructural . (B) Flor perteneciente al mutante *male sterile 30* (*ms 30*), con androesterilidad esporógena. (C) Flor perteneciente al mutante *exerto* (*ex*), con androesterilidad funcional.

2.3.2. Importancia de la androesterilidad en especies hortícolas

La obtención de plantas estériles masculinas es una herramienta importante para la producción de semilla híbrida en especies hortícolas y para evitar la transferencia horizontal de genes no deseados.

El desarrollo de cultivares híbridos por compañías de semillas y agricultores implica una importante inversión de tiempo y dinero. Los híbridos son el producto del

cruzamiento entre dos o más parentales genéticamente diferentes y se caracterizan por poseer mayor valor que éstos. Este valor viene determinado por un mayor vigor, rendimiento, mejor adaptabilidad y uniformidad. Además, los híbridos tienden a ser más tolerantes al estrés ambiental y más resistentes a enfermedades (Reynaerts *et al.*, 1993). La polinización cruzada es necesaria para la obtención de cultivares híbridos; por este motivo la androesterilidad en uno de los dos parentales es deseable para llevarla a cabo. Los híbridos comerciales se obtienen en todos los grupos vegetales, independientemente de su tipo de reproducción. Actualmente existen en el mercado excelentes híbridos de maíz, sorgo, cebolla, remolacha, girasol, arroz, tomate, pimiento, berenjena, coles, calabacines, zanahoria y colza transgénica. Los híbridos sólo pueden utilizarse en la primera generación y, por tanto, el agricultor debe recurrir al productor para adquirir la semilla cada año. El coste de estos cultivares híbridos es mayor que en otros tipos de cultivares, pero, este coste se ve compensado por el aumento de su producción, de su homogeneidad y, por la garantía de que año tras año se puede adquirir un producto con las mismas características.

La transferencia horizontal de genes depende de factores como el tipo de cultivo, la localización, la presencia/ausencia de cultivos cercanos sexualmente compatibles con ellos, etc. Existen dos mecanismos responsables de la transferencia de genes desde unos cultivos a otros: la dispersión mediante polen viable y la diseminación mediante semillas (que más tarde germinarán dando lugar a plantas que a su vez producirán polen). Por tanto, la principal manera de transferencia horizontal de genes es mediante el polen. Este mecanismo depende, a su vez de diversos factores como la cantidad de polen producida, la longevidad del mismo, las vías de dispersión (anemófila, entomófila), la supervivencia del polen, la distancia entre plantas, etc. Las plantas androestériles al no producir polen o ser éste inviable evitan el problema que se pueda ocasionar con la transferencia de genes entre cultivos.

2.3.3. Obtención de plantas androestériles mediante ingeniería genética

La biotecnología ha aportado nuevos métodos para obtener plantas androestériles que podrían ser útiles para la producción de semillas híbridas de diferentes cultivos. Toda la producción comercial de semillas híbridas se basa en establecer androesterilidad en una línea que servirá como parental femenino. Con este fin se han utilizado diversas estrategias:

1.- Alteración de metabolitos o reguladores del crecimiento que interfieren en la producción de polen viable

Entre las sustancias capaces de interferir en la producción de polen viable se encuentran aminoácidos, hidratos de carbono, flavonoides, ácido jasmónico, biotinas, auxinas, etc. En tabaco, la reducción de la actividad invertasa en las células tapetales de la antera durante estadios tempranos del desarrollo del polen provoca la interferencia en el suplemento de carbohidratos y bloquea el desarrollo de los granos de polen causando androesterilidad (Goetz *et al.*, 2001).

2.- Destrucción selectiva de tejidos necesarios para la producción de polen funcional

La destrucción selectiva de los tejidos puede llevarse a cabo mediante ablación genética o mediante la expresión de sustancias tóxicas para las células.

Tradicionalmente la ablación celular se ha llevado a cabo por métodos físicos, tales como microdissección o ablación láser en procesos de desarrollo animal, o genéticamente, mediante el uso de mutaciones que afectan líneas celulares específicas. Estos abordajes han sido utilizados en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Kimble, 1981; Sulston y White, 1980) pero son difíciles de aplicar a organismos que son menos susceptibles a las manipulaciones físicas o genéticas (Day e Irish, 1997). La ablación genética destruye tejidos inaccesibles a la ablación física, así como tejidos que están relacionados funcionalmente pero físicamente dispersos dentro de un organismo (Thorsness y Nasrallah, 1995).

La ablación genética se basa en la inducción de la muerte celular mediante la expresión de cualquier enzima (proteasas, lipasas, RNasas) que sea capaz de destruir la integridad de los tejidos necesarios para la producción de polen. Para obtener una eficiente ablación genética es crucial disponer de un gen citotóxico y de un promotor apropiado que controle la expresión espacio-temporal de éste. Los genes citotóxicos codifican proteínas que causan la muerte de las células donde se expresan (Day e Irish, 1997). Proteínas como la toxina A de la difteria (DTA), exotoxina A, la RNasa T1, la RNasa barnasa, etc, son letales porque eliminan la síntesis de proteínas por diversos mecanismos. Tanto la DTA como la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* inactivan los ribosomas, causando la inhibición de la síntesis de proteínas; las células donde se tendrían que expresar estas proteínas no se pueden dividir y, en consecuencia mueren (Day *et al.*, 1995).

Las ribonucleasas RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* y RNasa barnasa del *Bacillus amyloliquefaciens* provocan un efecto tóxico degradando los RNAs intracelulares

requeridos para la supervivencia de las células (Thorsness y Nasrallah, 1995). En los tejidos en los que se expresan estas RNAsas no se detecta la presencia de RNA mensajero.

Los promotores apropiados para la ablación génica corresponden a genes que se expresan exclusivamente en órganos reproductivos de la flor (estambres y carpelos) ya que serían, potencialmente, capaces de dirigir la expresión de genes citotóxicos hacia dichos órganos provocando esterilidad masculina o femenina de la flor. Los promotores que se seleccionen para expresar agentes citotóxicos o degenerativos del tejido deben ser promotores suficientemente activos y específicos de las células diana. La primera estrategia de ablación genética diseñada para producir androesterilidad en tabaco y colza fue propuesta por Mariani *et al.*, 1990. Para ello se utilizó el promotor del gen *TA29* de tabaco, específico de *tapetum* para dirigir la expresión de dos RNAsas (RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* y barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens*). Posteriormente también se han obtenido plantas androestériles de tabaco mediante la expresión de la *barnasa* bajo el promotor del gen *TA56* de tabaco que dirige la expresión del gen citotóxico al estomio y a otras partes de la antera implicados en la dehiscencia de la misma (Beals y Golberg, 1997). La expresión de la *barnasa* bajo el promotor específico de polen *PS1* también produjo plantas androestériles de tabaco (Zhan y Cheung, 1996). En los últimos años se han obtenido plantas androestériles de *Arabidopsis*, colza, tabaco, tomate y *Kalanchoe* utilizando el promotor *PsEND1* de guisante. Éste dirige la expresión de la *barnasa* a los tejidos estructurales de la antera desde estadios tempranos del desarrollo de la misma (Roque *et al.*, 2007; García-Sogo *et al.*, 2010).

Los mismos resultados obtenidos mediante ablación celular pueden conseguirse expresando sustancias tóxicas para las células, por ejemplo, péptidos que inactivan los ribosomas, como hace la cadena A de la toxina (DT-A) de *Corynebacterium diphtheriae* (Day *et al.*, 1997). También es posible la ablación de flores completas en plantas transgénicas en las que el gen que codifica la DT-A se expresa bajo el control del gen *LEAFY* (Nilsson *et al.*, 1998).

Sistema barnasa-barstar

La barnasa es el nombre de una ribonucleasa extracelular producida por *Bacillus amyloliquefaciens*. Esta proteína está formada por una cadena simple de 110 aminoácidos. El barstar fue descubierto por Smeaton y Elliott en 1967 como el inhibidor específico de la barnasa producido intracelularmente por el mismo organismo. Es una proteína que consta de 89 aminoácidos. Ni la barnasa ni el barstar contienen enlaces bisulfuro y no requieren de ningún catión divalente u otro

componente no peptídico para su función (Hartley y Smeaton, 1973). Estas dos proteínas forman un complejo equimolar no covalente: una molécula de barstar se une a una molécula de barnasa, aboliendo su actividad ribonucleasa. Dicho complejo es muy estable, como lo indica el hecho de que se necesita solamente un pequeño exceso de barstar para eliminar la actividad de la barnasa (Hartley y Smeaton, 1973). La barnasa le sirve a *B. amyloliquefaciens* como una enzima digestiva degradando el RNA exógeno y como una toxina para competidores o depredadores. La función biológica del barstar es proteger al *B. amyloliquefaciens* del efecto tóxico intracelular de la barnasa. El gen *barnasa* es letal para el organismo huésped cuando se expresa solo; por este motivo, los intentos iniciales de clonarla en *E.coli* y *B.subtilis* fueron fallidos. Su introducción en un plásmido de *E.coli* ha sido posible después de su inactivación en *B. amyloliquefaciens* por la inserción de un transposón (Paddon y Hartley, 1985), con la introducción de mutaciones puntuales específicas dentro del gen que provocan su letalidad (Paddon y Hartley, 1987) ó incluyendo el gen *barstar* junto con el de la *barnasa* en el plásmido (Zhan *et al.*, 1996; Roque *et al.*, 2007)

3. Características de calidad en tomate

Los objetivos de mejora de la calidad del fruto dependerán de los cultivares, de los métodos de cultivo utilizados (campo o invernadero) o de si el producto se va a utilizar para consumo en fresco o como fruto procesado.

3.1. Tomates para consumo en fresco

Como consecuencia de la importancia económica del cultivo del tomate, se han dedicado importantes recursos a investigar la obtención de nuevos cultivares que se ajusten mejor a las exigencias del mercado. Existe una gran competencia entre las casas productoras de semillas, lo que implica una aparición constante de nuevos cultivares que tienen, normalmente, una vida corta en el mercado al ser desplazados con rapidez por otros nuevos. En esta situación de gran competitividad, las exigencias para un producto como el tomate para consumo en fresco resultan muy grandes.

3.1.1. Caracteres vegetativos y reproductivos

Entre los caracteres vegetativos y reproductivos que se exigen en los nuevos cultivares destacan los siguientes:

1. Porte de la planta: en cultivares de otoño-invierno se requieren plantas con hojas pequeñas y colocadas en posición horizontal, puesto que así se facilita la aireación y se evitan los problemas sanitarios. En los cultivos de primavera-verano, se requieren plantas con hojas grandes para que proporcionen buena cobertura al fruto y que éste no se asolane.

2. Productividad o rendimiento: interesan cultivares altamente productivos pero que a la vez mantengan una uniformidad en cuanto al peso y tamaño del fruto. Estos parámetros de calidad comercial dependen del cultivar y de las condiciones de crecimiento de los mismos. El rendimiento del tomate puede dividirse en dos componentes principales: el número de frutos por planta (que depende del número de racimos por planta y del porcentaje de fructificación) y el peso medio de los frutos (que depende a su vez del número y del peso de los lóculos). El número de semillas y la competencia entre los frutos de una misma planta afectan al tamaño final del fruto (Bertin *et al.*, 1998).

3. Precocidad: en los cultivares desarrollados para el cultivo temprano en cualquier ambiente la precocidad tiene gran interés económico puesto que la producción conseguida en las épocas más tempranas se paga a precios más altos.

4. Adaptación a condiciones ambientales de estrés: las plantas durante su cultivo se ven sometidas a múltiples situaciones de estrés; por este motivo el mercado exige cultivares capaces de cuajar en condiciones de frío o calor y adaptados a tierras y aguas salinas.

5. Resistencia a plagas y enfermedades: para el agricultor, la utilización de cultivares que incorporen muchas resistencias a enfermedades fúngicas, bacterianas o víricas, es en cierto modo una garantía de obtener una buena producción. Sin embargo, lo más conveniente es utilizar cultivares con las resistencias a las enfermedades que supongan un verdadero problema en cada zona, ya que, el cultivo continuado de cultivares con muchas resistencias puede hacer que se seleccionen nuevos patotipos más agresivos que dificultarían el encuentro de nuevas resistencias.

3.1.2. Caracteres del fruto

La calidad de un producto no puede determinarse por una sola propiedad o factor aislado, sino por la combinación de todas sus características. Esta definición incluye tanto aspectos de calidad externa (forma, tamaño, color) como aspectos de calidad interna u organoléptica. Los aspectos de calidad externa pueden ser evaluados y

seleccionados fácilmente y son perceptibles por la vista o el tacto desde la primera toma de contacto con los frutos de tomate. La observación de todos estos caracteres condiciona la decisión de compra por parte del consumidor. Los aspectos de calidad interna u organoléptica se refieren fundamentalmente a las sensaciones que experimentamos al probar y consumir un alimento, relacionándose con los aspectos gustativos (dulzor, acidez), olfativos (aroma, perfume) y táctiles (firmeza, textura, etc.). Estos aspectos son más difíciles de evaluar y seleccionar y, de ellos va a depender la valoración final del fruto así como las decisiones de sucesivas adquisiciones por parte del consumidor.

La preocupación por realizar una dieta sana hace que las propiedades nutritivas de los frutos también sea un factor a tener en cuenta. El valor nutritivo puede definirse como el grado de utilidad que poseen los alimentos para satisfacer los requerimientos de diversas sustancias (azúcares, vitaminas, minerales) necesarias para el buen funcionamiento del organismo y la prevención de enfermedades (Shewfelt, 2000). Los atributos de calidad nutritiva no son directamente perceptibles por el consumidor.

La definición de calidad es relativa porque la combinación de factores que la definen debe ser tal que determine la percepción por el consumidor (Pretel *et al.*, 1993) y, por tanto, está fuertemente condicionada por las apetencias, necesidades y cultura gastronómica de los consumidores.

3.1.2.1. Calidad externa

La calidad externa es una característica esencial a tener en cuenta, cualidades como uniformidad en el tamaño y forma así como el color, son exigidas para cada variedad en función del mercado al que se va a destinar el producto.

Igualmente importantes son los aspectos relacionados con la presentación del fruto (ausencia de malformaciones, desórdenes fisiológicos (“cracking”, “microcracking”), amarilleamientos, podredumbre apical etc). También es deseable que el fruto posea larga vida comercial; este parámetro mide el tiempo de conservación de los frutos después de ser recolectados. Además, también se desea que los frutos presenten gran resistencia a la manipulación y al transporte.

Otros aspectos que se evalúan en la calidad externa del fruto es el tamaño de la cicatriz peduncular y estilar así como el aspecto de sus hombros. Muchas de los frutos son atacados por patógenos como *Phytophthora infestans* (mildiu) penetrando en el fruto a través de su cicatriz peduncular ó estilar. Además, se ha descrito que existe una correlación negativa entre la cicatriz peduncular del fruto y la altura de los hombros del mismo con su facilidad de pelado (García y Barret, 2006).

3.1.2.2. Calidad interna

Entre los caracteres de calidad interna a tener en cuenta destacan el sabor, aroma, flavor, firmeza y textura de los frutos.

Sabor

El sabor se define como una propiedad de determinadas sustancias que se percibe a través del gusto y guarda relación directa con su composición química. El ser humano es capaz de distinguir y percibir 5 sabores elementales: dulce, salado, ácido, amargo y umami. El sabor umami está causado por algunos aminoácidos, proporciona un gusto carnoso y fue incluido como sabor elemental hace unos años (Kawamura y Kare, 1987). Los estímulos gustativos son compuestos químicos no volátiles y solubles en agua, ya que deben actuar siempre en medio acuoso (saliva) (Laing y Links, 1996).

En tomate, el sabor guarda una relación directa con el contenido de azúcares reductores y ácidos orgánicos, que van a variar dependiendo del cultivar considerado y del grado de madurez del fruto. Variaciones en las concentraciones de azúcares y ácidos contribuyen significativamente a las variaciones de sabor del tomate, siendo más intenso el sabor a mayores concentraciones de estos compuestos (Stevens *et al.*, 1977). La glucosa y la fructosa son los principales azúcares presentes aproximadamente en la misma proporción en el tomate maduro; la sacarosa es la principal forma de transporte de fotoasimilados de las hojas. Los principales ácidos orgánicos son el cítrico y el málico. Azúcares y ácidos orgánicos representan casi la totalidad de los sólidos solubles del fruto de tomate.

Olor y Aroma

El aroma es la propiedad organoléptica perceptible por vía indirecta (retronasal) durante la degustación (UNE 87-001-94). Es diferente al olor, que se define como la propiedad organoléptica perceptible por vía nasal directa cuando se inspiran determinadas sustancias volátiles (UNE 87-001-94).

Mientras que el sabor característico de los alimentos normalmente se relaciona con una sola clase de compuestos, el aroma está caracterizado por un gran número de compuestos volátiles (Brossard *et al.*, 2007). El aroma está determinado por sustancias volátiles que a pesar de su bajísima concentración son detectados por los órganos gustativos y olfatorios confiriendo al tomate una personalidad particular. Estos constituyentes volátiles pertenecen a diferentes grupos orgánicos: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos, hidrocarburos, aminas, amidas, etc. En tomate se han

identificado unos 400 compuestos volátiles, de los que se considera que solamente unos 30 son los principales responsables del aroma en el tomate fresco, siendo casi todos ellos derivados del metabolismo de los ácidos grasos y de aminoácidos o de la degradación de los carotenoides. El aroma típico de los tomates es el resultado de una combinación desconocida de muchos de estos compuestos volátiles (Buttery y Ling, 1993) y además presenta importantes diferencias entre cultivares (Cebolla-Cornejo *et al.*, 2006).

Flavor

El flavor es el conjunto de percepciones de estímulos que se producen en la cavidad bucal y nasal durante la ingesta de un alimento, resultado de la interacción entre los compuestos químicos del alimento con los receptores del gusto, trigeminales y olfativos (Fisher y Scott, 2000). El característico flavor del tomate es fruto de las interacciones que se establecen entre los azúcares reductores, ácidos libres, aminoácidos, minerales y cientos de compuestos volátiles presentes en este fruto.

Algunos autores han otorgado mayor importancia relativa a los azúcares y ácidos (Stevens, 1979; Jones y Scott, 1984; Malundo *et al.*, 1995), y otros a los compuestos volátiles (Buttery *et al.*, 1987; Krumbein y Auerswald, 1998; Brauss *et al.*, 1998; Berna *et al.*, 2005b). En general, se ha constatado que los tomates más dulces son mejor aceptados, siempre que se encuentren dentro de un nivel de acidez óptimo (Malundo *et al.*, 1995) y que existe una alta correlación entre el perfil aromático del tomate y la aceptabilidad por parte del consumidor (Berna *et al.*, 2005b).

Aminoácidos y minerales ejercen una contribución más sutil sobre el flavor. Los primeros pueden realzar el sabor del fruto y tener un efecto tampón (Bucheli *et al.*, 1999), mientras que los segundos ejercen un efecto tampón e influyen fundamentalmente sobre el pH y la acidez titulable del tomate.

A pesar de que el tomate ha sido objeto de numerosos estudios, tanto analíticos como sensoriales, actualmente no se dispone de una definición exacta y cuantificable del que sería su flavor típico o deseable (Bucheli *et al.*, 1999; Baldwin *et al.*, 2000). Esta situación es reflejo de las dificultades que entraña el estudio del flavor de los alimentos, y en particular del tomate. Establecer la relación entre los datos instrumentales y sensoriales del flavor del tomate es todavía hoy una de las asignaturas pendientes del estudio del flavor (Tandon *et al.*, 2003; Thybo *et al.*, 2005; Serrano-Megias y López-Nicolás, 2006). Los ensayos analíticos se pueden realizar sobre muestras representativas de tomates de un mismo cultivar, sin embargo, los consumidores juzgan la calidad de frutos individuales, entre los que existe una gran

variabilidad (Brauss *et al.*, 1998). Así mismo, las preferencias de los consumidores por unos atributos sensoriales determinados son muy variadas y cambian en función del país, del tipo de población, factores socio-económicos, uso al que se destina el fruto, etc. (Ruiz *et al.*, 2005).

Recientemente se ha definido un tomate con pleno flavor como aquel que presenta un nivel alto de sólidos solubles y azúcares, un menor nivel de ácidos orgánicos y un nivel medio-alto, aunque sobre todo equilibrado, de compuestos volátiles como hexanal, cis-3-hexanal, 2- y 3-metil-1-butanol, trans-2-hexenal, cis-3-hexen-1-ol, geranilacetona, β -ionona y 1-penten-3-ona (Tandon *et al.*, 2003). Otro de los factores que complica la investigación sobre el flavor del tomate es la falta de una mejor comprensión sobre las interacciones que se establecen entre sus componentes. Se ha constatado que la concentración de ciertos compuestos volátiles en el alimento influye sobre la percepción dulce o amarga del mismo. Los compuestos que aportan notas “florales” o “frutales”, como las cetonas, aumentan la sensación de dulzor del tomate sin aumentar su contenido en azúcares; mientras que algunos de los compuestos asociados con notas “verdes”, como los aldehídos C6, aumentan la sensación de amargor (Balwin *et al.*, 1998; Baldwin *et al.*, 2004). No sólo los compuestos volátiles pueden afectar la percepción del sabor dulce o amargo, los azúcares también influyen sobre la percepción global del aroma. Baldwin y Thompson, 2000 constataron que el aumento de azúcares, especialmente de sacarosa y fructosa, se traducía, a partir de una cierta concentración, en una disminución de la percepción del aroma global.

Se conocen los factores que influyen sobre el flavor del tomate (el tipo de cultivar, el clima durante el cultivo, el estado de maduración del fruto, las prácticas culturales, el manejo postcosecha, etc) (Baldwin *et al.*, 2000; Thybo *et al.*, 2005), sin embargo, su efecto y modo de acción sobre los componentes del flavor no han sido todavía descritos.

En las últimas décadas, el creciente descontento del consumidor hacia los tomates que encuentra en el mercado, carentes del flavor característico de este producto y, el hecho de que esté dispuesto a pagar un valor añadido por un producto que cumpla sus expectativas, han impulsado trabajos dirigidos a mejorar el flavor del tomate, y en particular su aroma (Bruhn *et al.*, 1991).

Textura

La textura es una característica que depende de muchas cualidades estructurales, como la proporción de carne y semillas, el tamaño y la forma de las células, la

fortaleza de las paredes celulares y la fortaleza de las conexiones entre las células. En la textura influyen diversos aspectos como la firmeza y la harinosidad del fruto.

La firmeza del tomate es una característica mecánica de calidad importante para conseguir un tomate de textura agradable. Es importante porque influye en la resistencia de los frutos a las manipulaciones y en su masticabilidad. Para evaluar la firmeza se han aplicado diversos métodos no destructivos que miden la resistencia que opone el fruto a la penetración, corte o compresión (Zerbini *et al.*, 1991). La firmeza del fruto depende de la estructura de su pared celular y del grado de unión de sus células. La presencia de células pequeñas en la piel del tomate favorece una piel más dura y una textura más firme. Cuanto más fuertes sean las conexiones entre las células y las paredes celulares, más firme será el tomate.

La harinosidad del fruto viene determinada por la forma de las células (cuanto más alargadas son las células, más harinoso será el pericarpo) y por la fortaleza de las paredes celulares y conexiones entre las células del pericarpo. Si las paredes de las células son bastante fuertes pero las conexiones entre ellas son débiles, el tomate tendrá una textura harinosa. En caso contrario, si las paredes son débiles pero las conexiones fuertes, el tomate tendrá una textura crocante, como una manzana crujiente.

La textura, por diferentes aspectos y, sobre todo debido a la heterogeneidad del fruto, es difícil de medir de manera instrumental; por tanto, la valoración de la misma hoy en día se hace principalmente con análisis sensoriales.

3.1.2.3. Calidad nutritiva

En lo que respecta al valor nutritivo del fruto, en el tomate para consumo en fresco, el contenido en minerales y en sustancias con actividad antioxidante (vitaminas, pigmentos y compuestos fenólicos) es más importante que el contenido de azúcares reductores, ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos y lípidos.

El tomate fresco es una fuente importante de vitaminas, principalmente vitaminas C y E. Estas dos vitaminas pueden jugar un papel clave en el retraso de la patogénesis de diversas enfermedades degenerativas, tales como enfermedades cardiovasculares (Libby y Aikawa, 2002), ciertos cánceres (You *et al.*, 2000), desórdenes neurológicos (Lee *et al.*, 2001) y cataratas (Valero *et al.*, 2002).

El tomate tiene una baja concentración de pigmentos, sin embargo, éstos tienen un gran valor nutricional (Davies y Hobson, 1981). Los carotenoides son uno de los principales grupos de pigmentos. En frutos rojos de tomate el licopeno es el pigmento más abundante, representando más del 90% de los carotenoides totales; además,

también encontramos, en cantidades menores, otros pigmentos como β -caroteno, δ -caroteno, γ -caroteno, neurosporeno, fitoeno y fitoflueno (Gross, 1991). Licopeno y β -caroteno son los pigmentos de mayor valor nutricional; en concreto, el licopeno tiene importantes propiedades dietéticas, ya que previene cánceres graves y reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Abushita *et al.*, 1997). Tanto el tomate como productos procesados del tomate se consideran una de las principales fuentes de licopeno para el cuerpo humano (Chug-Ahuja *et al.*, 1993). El β -caroteno es un carotenoide con actividad de provitamina A y su deficiencia puede causar xerofltalmia, ceguera y muerte prematura (Mayne, 1996), que constituyen un problema nutricional importante en más de 75 países, la mayoría de ellos en vías de desarrollo.

Los principales compuestos fenólicos en el tomate son la quercitina, naringenina y ácido clorogénico (Clifford, 1999; Hertog *et al.*, 1992). Debido a su estructura, los compuestos fenólicos son eficientes antagonistas de la acción de los radicales peróxido (Auroma, 1999).

3.2. Tomates para procesamiento industrial

La recolección de los tomates que se utilizan en la industria suele ser mecanizada; este tipo de recolección requiere que los cultivares presenten determinadas características vegetativas, reproductivas y referentes al fruto.

3.2.1. Caracteres vegetativos y reproductivos

El porte de la planta, la maduración del fruto, el desprendimiento del fruto por el pedúnculo, la consistencia de los mismos y la resistencia a enfermedades, son factores importantes a la hora de seleccionar un cultivar de tomate para la industria.

1. Porte de la planta: La planta debe presentar un crecimiento determinado y fenotipo compacto, ya que el cultivo no va a ser entutorado y de esta manera se evita la rotura del tallo y de las ramas del mismo. La planta también debe mostrar un buen desarrollo foliar para mejorar la eficiencia de la fotosíntesis y proporcionar a los frutos una buena cobertura que impida las quemaduras ocasionadas por la exposición directa al sol.

2. Maduración: Se requiere que los frutos de los cultivares elegidos maduren al mismo tiempo, en la fecha de la recolección; de esta manera la recolección puede automatizarse sin producir pérdidas para el agricultor.

3. Desprendimiento del pedúnculo: Es deseable que los frutos se desprendan con facilidad de la mata sin el pedúnculo y sin el cáliz. Para ello, la cicatriz de inserción con

el cáliz tiene que ser pequeña y poco suberosa. Este tipo de cicatriz favorece el desprendimiento del fruto de su pedúnculo en la recolección y disminuye las probabilidades de rajado del fruto por esta zona. Tanto el pedúnculo como los tejidos suberizados de la cicatriz del cáliz aportan fibras gruesas, ásperas y de mal color que dan mala calidad a los productos elaborados (Frery *et al.*, 2004).

4. Resistencia a plagas y enfermedades: existen diversas plagas que afectan a la producción del tomate destinado a uso industrial para las que el único método de control es la propia resistencia genética. Para ello se emplean cultivares que presenten el mayor número de resistencias a las enfermedades, principalmente a los parásitos del suelo, como *Verticilium*, *Fusarium* y nematodos

3.2.2. Caracteres del fruto

3.2.2.1. Calidad externa

Los frutos deben tener un tamaño homogéneo y, preferiblemente redondo-ovales o con forma de ciruela; su superficie debe ser lisa y sin depresiones en la zona de unión con el pedúnculo. Estos aspectos son esenciales para realizar una buena recolección mecanizada y para la elaboración de conservas de tomate pelado entero.

El color del fruto maduro debe ser uniforme y rojo intenso; en todos los productos elaborados del tomate el color es el parámetro de calidad más importante y depende directamente del tipo varietal utilizado y del momento de la maduración en el que se realizó la recolección.

Los frutos deben ser resistentes al agrietado para evitar ataques de microorganismos, ya que éstos penetran al interior del fruto depreciando la calidad de los mismos.

Con independencia del producto a elaborar, la morfología interna del fruto fresco también afecta directamente al rendimiento y a la calidad de los productos elaborados del tomate. Es importante que tengan poco zumo y que las paredes exteriores y radiales del pericarpio sean gruesas y firmes, para que, durante la recolección, el transporte y la descarga en fábrica, se produzca la menor pérdida posible de zumo en frutos rotos o rajados y, para que en esas operaciones no se produzcan fermentaciones y contaminaciones microbianas (Stommel *et al.*, 2005). La columna central del pericarpio de un buen tomate para uso industrial también debe ser firme y gruesa y no debe estar muy suberificada ni decolorada en las zonas próximas a la cicatriz del pedúnculo. También en relación con la firmeza del fruto están la ausencia de huecos en los lóculos, el número de lóculos y el tamaño de los mismos (cuanto más pequeños, mejor). Por último una piel flexible, que permita un pelado fácil, es un

requisito imprescindible en aquellos cultivares destinados a la elaboración de tomate en dados y tomate pelado (entero o en trozos), productos en los que, además, la calidad depende directamente del grosor y firmeza del pericarpo (Brummell *et al.*, 2002; Brummel y Harpster, 2001).

En cualquier partida de tomate fresco destinada a elaboración industrial, además de tomates que reúnen los requisitos anteriormente mencionados, hay cantidades variables de tomates defectuosos e impurezas (ramas, tierra, hojas) que hay que eliminar. Estos elementos, además de afectar negativamente a la calidad del producto elaborado, disminuyen el rendimiento en fábrica e incluso pueden originar problemas en los sistemas de recepción de materia prima. Un aspecto interesante en los procesos de preparación de alimentos derivados del tomate a escala industrial (purés, sopas, zumos ó salsas de tomate) sería contar con frutos sin semillas. Las semillas se eliminan por tamizado antes de procesar las muestras, por lo que la utilización de frutos sin semillas sería una manera de ahorrar tiempo y dinero. Además, la eliminación de las semillas evita la aparición de olores y sabores rancios y desagradables que pueden surgir como consecuencia de la oxidación de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados presentes en las semillas que se liberan durante el procesado industrial.

3.2.2.2. Calidad interna

Entre los parámetros físico-químicos que determinan la calidad interna de la pulpa, cabe destacar: el color y el contenido en sólidos solubles. En lo que respecta al color, interesa que sea un tono rojo lo más puro posible, intenso y oscuro. El contenido en sólidos solubles es el parámetro que más influye en el rendimiento durante la elaboración del concentrado (Yousef y Juvik, 2001). Lo deseable es conseguir un elevado contenido en sólidos solubles ya que, cuanto mayor es éste menor cantidad de agua habrá que evaporar para obtener la misma cantidad de tomate concentrado (Baxter *et al.*, 2005), consumiendo también menos energía.

El concentrado destinado a la elaboración de ketchup y ciertas salsas debe ser lo más consistente posible (Brummell *et al.*, 2002; Kalamaki *et al.*, 2003). La consistencia de un zumo o de un concentrado de tomate es un carácter complejo, en el que intervienen dos factores: la viscosidad del producto y la capacidad de retención de líquidos por parte de la fase sólida del mismo. El pH del zumo es un índice de calidad que está directamente relacionado con la conservación del producto terminado (Yousef y Juvik, 2001); si el pH está por encima de 4,4 se requiere mayor energía para la esterilización que si el pH es menor.

El sabor y el aroma son dos caracteres de calidad íntimamente ligados y que cada vez cobran mayor importancia. La complejidad de estos caracteres hace que su determinación objetiva aún no esté bien definida. La característica más determinante del sabor es la proporción azúcares : ácidos en el fruto (Bucheli *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000; Stommel *et al.*, 2005).

El aroma característico del tomate natural se relaciona con el contenido de una amplia gama de compuestos aromáticos entre los que destacan algunos aldehídos volátiles derivados de la ruta oxidativa de los ácidos grasos (Shook *et al.*, 2001; Stommel *et al.*, 2005). Además de ser caracteres que dependen de factores genéticos, el sabor y el aroma dependen de las condiciones ambientales.

3.2.2.3. Calidad nutritiva

Cada vez es más importante desde el punto de vista de la calidad del tomate concentrado, su contenido en sustancias beneficiosas para la salud (Kalamaki *et al.*, 2003). Se ha comprobado que el tomate posee cantidades significativas de determinados compuestos orgánicos con efecto antioxidante, entre los que destaca el licopeno (Roselló *et al.*, 2002; Stommel *et al.*, 2005). Otros compuestos beneficiosos presentes en el tomate son otros carotenoides, ácido ascórbico y polifenoles (Jones *et al.*, 2003; AMITOM, 2005a). Muchas de estas sustancias se mantienen en cantidades importantes tras los procesos industriales e incluso algunas de ellas, como el licopeno, se asimilan mejor por el organismo humano en los productos elaborados.

4. Estado actual de la calidad organoléptica del tomate y objetivos de mejora

Actualmente se pueden diferenciar dos tipos de cultivares comerciales de tomate: los cultivares tradicionales y los híbridos. Es necesario describir las características propias de cada uno de estos tipos de material vegetal porque los objetivos de mejora para cada uno de ellos son distintos.

Los cultivares tradicionales presentan en general una buena adaptación al ambiente en el que se cultivan y presentan una excelente calidad organoléptica, aunque el aspecto del fruto, su uniformidad y la resistencia de la planta a patógenos sean deficientes en muchos casos. En ellos, los objetivos de mejora no incluyen generalmente la mejora de la calidad interna, sino la inclusión de resistencias a patógenos. Cabe resaltar que estos cultivares atesoran una amplia variabilidad

genética (Adalid *et al.*, 2005, Cebolla-Cornejo, 2005) y son muy interesantes como fuente de variabilidad para la mejora de la calidad interna de los cultivares híbridos.

Los cultivares híbridos están adaptados a las cadenas de producción-consumo, presentan una gran diversidad de tipos, corta permanencia en el mercado, tienen incorporadas diversas resistencias a patógenos y producen frutos con buena calidad externa. Sin embargo, hace años que los consumidores se quejan de la pérdida de calidad organoléptica de estos cultivares. Esta pérdida de calidad organoléptica ha sido debida a que se ha dado prioridad a otras exigencias comerciales (buena presentación y conservación). Además, la baja calidad de estos cultivares también está asociada al cultivo fuera de estación y a la recolección del fruto en un estado excesivamente verde para prolongar su vida comercial (Nuez, 1995).

Las exigencias de calidad organoléptica de los consumidores se traducen en un objetivo de mejora inaplazable en estos cultivares. Para desarrollar este objetivo es importante incrementar el contenido en azúcares y ácidos orgánicos puesto que éstos influyen directamente sobre la intensidad de sabor (Stevens *et al.*, 1977). Resulta necesario recuperar los perfiles aromáticos típicos de los cultivares tradicionales, ya que estos compuestos volátiles condicionan en gran medida no sólo el aroma sino también el sabor de los frutos de tomate (Buttery y Ling, 1993). Los cultivares híbridos que se comercializan actualmente presentan frutos con carne firme y maduración lenta (permitiendo una vida comercial más larga). Estos cultivares con características de larga vida comercial presentan mutaciones en genes que afectan al proceso de maduración del fruto (*rin*, *nor*, *Nr* y *Nr-2*) pero, tienen características deficientes de sabor y aroma (Chalukova y Manuehyan, 1991; McGlasson *et al.*, 1987).

5. Dificultades de la mejora de la calidad organoléptica en tomate y perspectivas de futuro

Actualmente existen dos grandes estrategias para obtener líneas de mejora con el fin de incrementar su calidad organoléptica, mediante mejora genética clásica y mediante ingeniería genética.

Mejora genética clásica

Se basa en explotar la amplia variabilidad natural para componentes de sabor presentes en el género *Solanum*. Los parentales donantes se seleccionan del germoplasma de tomate silvestre y cultivado (especialmente cultivares tradicionales)

después de evaluar sus características de calidad organoléptica. Posteriormente, se inicia un programa de mejora que incluye cruzamientos con líneas de mejora, varias generaciones de retrocruzamientos (en ocasiones con generaciones de autofecundación intercaladas) y selección por características de sabor y comportamiento agronómico.

Los intentos de la genética clásica para mejorar el flavor del tomate se han visto limitados, fundamentalmente por dos dificultades. La primera es conseguir una caracterización rápida, amplia y precisa del sabor en líneas de tomate. La segunda es la elevada influencia ambiental en la expresión de las propiedades de sabor en tomate (Dorais *et al.*, 2001; Tandon *et al.*, 2000; Veit *et al.*, 1999). Estos dos factores hacen la selección de genotipos élite muy compleja.

El sabor del tomate es un carácter muy complejo y por ello es muy difícil tener criterios claros e incuestionables para caracterizarlo. Hay muchos compuestos químicos implicados y, no sólo es importante la cantidad existente de cada compuesto, sino que también es importante la proporción entre ellos. Para simplificar los criterios de selección y valoración, los mejoradores han intentado evitar las determinaciones sensoriales reemplazándolas con determinaciones analíticas, más fáciles y más rápidas de realizar, de los principales compuestos químicos no volátiles involucrados en el sabor del tomate. De este modo, se han determinado, en muchos trabajos, variables que agrupan conjuntos de sustancias, como contenido en sólidos solubles (^oBrix), pH o acidez titulable, las cuales están relacionadas con algunos aspectos del sabor, como la intensidad (Stevens *et al.*, 1977). Actualmente, las medidas de estos parámetros pueden ser complementadas por determinaciones químicas precisas de cada uno de los componentes no volátiles involucrados en el sabor del tomate.

Junto a las dificultades en la cuantificación química de los componentes del sabor del tomate existe otro problema: la elevada influencia de variables agronómicas y ambientales (manejo del cultivo, estación del año, localidad, condiciones climáticas durante el crecimiento, precocidad del fruto) en las características del sabor de los frutos de tomate (Tandon *et al.*, 2000). Por ejemplo, la reducción en el aporte de agua implica mayores valores de azúcares, ácidos totales, algunos compuestos volátiles (hexanal, (Z)-3-hexenal y (E)-2-hexenal) y ácido ascórbico, los cuales incrementan la calidad de los frutos de tomate (Veit *et al.*, 1999). Por ello, junto con el desarrollo de métodos de cuantificación rápida y precisa de componentes de calidad interna son necesarios estudios que permitan modelizar las fluctuaciones causadas por factores como el ambiente y variables agronómicas en el contenido de componentes de calidad interna en tomate. De esta forma se podría precisar cual es

la contribución del genotipo (separándola de la contribución del medio ambiente) en la expresión de propiedades de sabor y caracterizar genotipos de élite con más precisión.

Ingeniería genética

La introducción artificial de genes, procedentes de otros organismos o sintetizados *in vitro*, ha empezado a cobrar importancia debido al gran desarrollo de la ingeniería genética en las últimas décadas. Estos genes foráneos pueden alterar una o varias rutas metabólicas y aumentar el contenido en uno o varios compuestos relacionados con la calidad organoléptica.

En levaduras, se han utilizado estrategias encaminadas a la construcción de cepas recombinantes que sobreexpresan enzimas glicosidasas y enriquecen la fracción aromática de los vinos al liberar varios alcoholes y terpenos aromáticos presentes en el mosto en forma de precursores glicosilados (Genovés *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 2005).

En plantas de tomate la sobreexpresión, mediante transformación genética, de genes que codifican enzimas como la sacarosa fosfato sintetasa ha mostrado diversas respuestas en cuanto al aumento del contenido de azúcares en el fruto. En algunos casos, hay un aumento en el contenido de azúcar en el fruto como resultado de un cambio en la partición del carbono entre almidón, sacarosa y compuestos iónicos (principalmente aminoácidos), más que un aumento en la síntesis (Laporte *et al.*, 1997; Laporte *et al.*, 2001). En otros casos la transformación ha resultado ineficaz ya que no altera los niveles normales de azúcares ni de otros compuestos del sabor (Lunn *et al.*, 2003). La transformación genética con una glutamato deshidrogenasa procedente de *A. nidulans* aumentó significativamente los niveles de aminoácidos libres totales en los frutos transgénicos (Kisaka y Kida, 2003). También se han llevado a cabo estrategias para tratar de retrasar la maduración de los frutos alterando la expresión de genes implicados en la ruta de biosíntesis, percepción y señalización del etileno en tomate.

El primer tomate transgénico autorizado para su consumo en USA fue el Tomate FlavSavr, desarrollado por Calgene Inc. (USA), en 1995. En los tomates FlavSavr se ha introducido una secuencia RNA antisentido de una enzima poligalacturonasa (PG) que rompe la pectina de las paredes celulares produciendo un ablandamiento del fruto. Estos tomates poseen niveles muy bajos de PG y, en consecuencia, durante la maduración del fruto no se produce ablandamiento del mismo, por lo que puede ser transportado hasta el consumidor en perfecto estado. De manera similar,

la transformación de tomate con una secuencia RNA antisentido de una pectinasa ha conseguido mejorar la textura y la consistencia del tomate impidiendo el proceso de maduración. Esta enzima se activa en el curso del envejecimiento del fruto produciendo una degradación de la pared celular y la pérdida de la consistencia del fruto (Foolad, 2007). La reducción de su expresión retrasa la maduración del fruto.

Otras aproximaciones a la manipulación de la calidad organoléptica del tomate a través de la ingeniería genética han sido el descubrimiento de los principales genes que regulan la biosíntesis de los carotenoides, con objeto de incrementar los niveles de β -caroteno y licopeno (Bramley, 2002). Además, se han utilizado diferentes estrategias para incrementar los niveles endógenos de flavonoides en tomate y para introducir nuevos flavonoides que normalmente están ausentes en este fruto (Verhoeven *et al.*, 2002; Bovy *et al.*, 2007).

La ingesta de alimentos con antocianinas, pigmentos antioxidantes producidos por algunas plantas, contribuye a la protección frente a un gran número de enfermedades humanas. Sin embargo, los niveles de estas sustancias en las frutas que más se consumen habitualmente no son suficientes para conseguir esa protección. Un equipo investigador del John Innes Centre (Norwich), liderado por Cathie Martin, introdujo dos genes (*Del* y *Ros1*) de la especie *Anthirinum majus*, rica en antocianinas, en el genoma del tomate (Butelli *et al.*, 2008). Estos frutos de tomate, con la pulpa y la piel moradas, presentaron una concentración de antocianinas elevada, similar al existente en moras y arándanos. Posteriormente se han incluido estos tomates transgénicos en la dieta de ratones de laboratorio propensos a padecer cáncer consiguiéndose prolongar sustancialmente su vida. Actualmente se está estudiando la inclusión de estos tomates en la dieta humana como una forma fácil de aumentar la ingesta de antioxidantes consiguiendo efectos beneficiosos sobre la salud.

También se ha intentado cambiar el perfil aromático de los frutos de tomate mediante transformación genética. Se ha conseguido aumentar el contenido de ácido palmitoleico, ácido 9,12-hexadienoico y ácido linoleico al expresar el gen *delta-9 desaturasa* de levadura en tomate. Estos cambios en el perfil de ácidos grasos han sido asociados con cambios en ciertos compuestos aromáticos derivados del metabolismo de ácidos grasos (cis-3-hexenol, hexanol, hexanal y cis-3-hexanal). Además también se incrementaron ciertos componentes del sabor no derivados de ácidos grasos, como 6-metil-5-hepten-2-ona y 2-isobutiltiazol (Wang *et al.*, 1996).

El silenciamiento y caracterización de genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de determinados compuestos volátiles han aportado nuevos conocimientos sobre la ruta de biosíntesis de los mismos. Este es el caso de la enzima alcohol

deshidrogenasa ADH, se ha visto que el incremento de su actividad aumenta los niveles de hexanol y Z-3-hexenol (Speirs *et al.*, 1998), de la lipoxigenasa LOX, implicada en la síntesis de hexanal (Ferrie *et al.*, 1994), o de dioxigenasas, como LeCCD1 (The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1), que contribuyen a la formación de volátiles como β -ionona, pseudoionona y geranilacetona (Simkin *et al.*, 2004).

Todos estos resultados indican que la ingeniería genética es una opción prometedora para mejorar la calidad organoléptica del tomate, incrementando el contenido de azúcares, aminoácidos ó modificando su perfil aromático, sin alterar el resto de componentes. Esto permitiría al mejorador dirigir puntualmente los cambios deseados sin alterar el fondo genético restante de la línea a mejorar y, en consecuencia, la mejora de caracteres tan complejos como el sabor se aceleraría. También se podrían utilizar diferentes combinaciones de secuencias para desarrollar plantas transgénicas con diferentes matices de sabor.

Estas aproximaciones biotecnológicas, encaminadas a mejorar la calidad organoléptica, aportan un beneficio que es percibido directamente por los consumidores.

6. El tomate como sistema modelo para estudios del desarrollo

El tomate se ha convertido en un excelente modelo para el estudio de procesos del desarrollo en las plantas, como el hábito de crecimiento durante la fase vegetativa o la fructificación. Entre las características que han permitido que el tomate se utilice como especie modelo destaca el hecho de que se trata de una planta autógama diploide ($2n=24$), presenta un ciclo de vida relativamente corto, un elevado potencial reproductivo, de fácil polinización y propagación vegetativa. Además su genoma es relativamente pequeño (950 Mb) y existen numerosos recursos genéticos y genómicos disponibles: poblaciones cartografiadas, marcadores de DNA (Tanksley *et al.*, 1992), colecciones de ESTs (Sol Genomic Network: <http://sgn.cornell.edu>), con aproximadamente 150.000 secuencias disponibles (<http://www.jspcmb.jp/pbcontents/pb22-2.html>) (Yamamoto *et al.*, 2005). También se dispone de 4 micromatrices (TOM1, de cDNA, TOM2, de oligonucleótidos, Agilent Tomato Array y Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array) y bases de datos públicos (revisado por Yano *et al.*, 2007) así como de librerías de insertos genómicos tipo YAC (Bonnema *et al.*, 1996) y BAC (Hamilton *et al.*, 1999; Budiman *et al.*, 2000). Asimismo, en 2004 se inició el programa de secuenciación de genoma del tomate a través del consorcio internacional Solanaceae Genome Project (SOL) (Mueller *et al.*,

2005) finalizándose en 2009. En la actualidad se dispone de una versión preliminar de la secuenciación del genoma del tomate. Todos estos aspectos junto a la posibilidad de transformar la planta han hecho que el tomate sea uno de los modelos más efectivos entre las especies cultivadas. A diferencia de otras especies utilizadas como modelo, el tomate es una especie hortícola con gran importancia económica.

6.1. Genómica funcional de plantas

La genómica funcional es un campo de la biología molecular que se centra en el estudio y caracterización simultánea y global de los genes, RNAs, proteínas, metabolitos implicados en un determinado proceso biológico, así como de sus posibles interacciones.

El primer genoma secuenciado en plantas fue el de *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) seguido por el de arroz (Yu *et al.*, 2002; Goff *et al.*, 2002; International Rice Genome Sequencing Project, 2005) y, recientemente por el de *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006) y *Vitis vinifera* (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007). La secuenciación de otras especies vegetales de interés agronómico como trigo, soja, patata o naranjo, entre otras, se está llevando a cabo en la actualidad. El programa de secuenciación del genoma del tomate se inició en 2004, a través del Consorcio Internacional Solanaceae Genome Project (SOL) (Mueller *et al.*, 2005), finalizándose en 2009. En la actualidad se dispone de una versión preliminar de la secuenciación del genoma del tomate.

Pero además de la secuencia genómica también es importante conocer cómo la función de cada gen determina la estructura de un organismo, así como las funciones necesarias para su crecimiento, desarrollo, reproducción e interacción con el entorno para llegar al total conocimiento de los sistemas biológicos.

Se están llevando a cabo numerosos estudios de genómica funcional, tanto en las especies modelo, como *Arabidopsis thaliana* y arroz (Yuan *et al.*, 2005), como en especies de interés agronómico como la patata, *Medicago truncatula*, soja, maíz, trigo o tomate. Estos estudios pueden consultarse en las siguientes direcciones de correo electrónico: (<http://www.arabidopsis.org/portals/masc/index.jsp>), (<http://www.usricegenome.org/tdb/potato/>), (<http://www.noble.org/medicago/>), (<http://soybeangenomics.cropsci.uiuc.edu/>), (<http://www.maizegdb.org/>), (<http://www.btny.purdue.edu/usdars/wheatgen/index.html>) (<http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato/project/>).

6.2. Colecciones de ESTs y micromatrices de DNA

Dificultades de la secuenciación total de especies vegetales: colecciones de ESTs

Los genomas de las especies vegetales con interés agronómico son generalmente de gran tamaño. Mientras que plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* tiene un genoma de tan solo 125 Mb, otras especies presentan genomas mucho mayores, como *Zea mays* (2.504 Mb), *Medicago sativa* (1.510 Mb) o *Solanum lycopersicum* (950 Mb). La mayor parte del DNA responsable de este gran tamaño es DNA repetitivo que rinde poca información génica y complica el ensamblaje posterior de la secuencia. La decisión de secuenciar un genoma de una especie de interés agronómico es, por tanto, una decisión difícil, que intenta equilibrar el tamaño del genoma y el coste de secuenciación en tiempo y dinero, con el impacto social, económico y científico, la distancia filogenética con plantas previamente secuenciadas y la información relevante de estudios previos (mapas físicos, genéticos).

En los últimos años se han desarrollado estrategias de secuenciación en masa de ESTs (Expressed Sequence Tags) que permite obtener primero información sobre genes expresados, dejando la información de genoma completo para un paso posterior.

En plantas se han identificado genes expresados diferencialmente en distintos tejidos mediante el análisis de colecciones de ESTs en arroz (Ewing *et al.*, 1999), patata (Ronning *et al.*, 2003), trigo (Ogihara *et al.*, 2003) y cebada (Zhang *et al.*, 2004), entre otras. Asimismo, esta metodología se ha desarrollado para la identificación de genes relacionados con la maduración del fruto en tomate (Fei *et al.*, 2004).

Micromatrices de DNA

En la última década se han producido un gran número de avances tecnológicos para determinar los niveles de expresión de los genes. En particular la tecnología de las micromatrices ha revolucionado la biología molecular, de modo que actualmente es la más utilizada en experimentos de expresión génica a gran escala puesto que permite la detección de simultánea de miles de transcritos (Busch y Lohmann, 2007). La capacidad de medir la expresión génica de todos los genes de un organismo en un solo experimento constituye un potente sistema analítico para evaluar las diferencias de la expresión génica global entre distintos tejidos, diferentes estadios del desarrollo, mutantes frente al genotipo silvestre, etc. (Meyers *et al.*, 2004).

La tecnología de las micromatrices se apoya en la existencia de colecciones de ESTs o datos de secuencia genómica, en instrumentación robótica con capacidad de trabajo a muy pequeña escala y en compuestos fluorescentes para la detección simultánea de

poblaciones de transcritos derivadas de diferentes muestras (Alba *et al.*, 2004). Además, el conjunto masivo de datos generado en un experimento de análisis de expresión génica mediante micromatrices requieren la convergencia de la biología, las matemáticas y la bioinformática (Meyers *et al.*, 2004).

Una micromatriz de DNA consiste en un conjunto de secuencias de DNA (sondas) inmovilizadas sobre una superficie sólida y organizado en cuadrículas microscópicas mediante un sistema de robótica (Alba *et al.*, 2004). Los datos de la expresión génica se obtienen mediante hibridación de la micromatriz con una población de RNA o cDNA marcado con fluorescencia, procedente de la muestra problema, de modo que se obtiene una señal de fluorescencia para cada sonda, cuya intensidad representa el nivel de expresión de dicho gen en la muestra problema (Busch y Lohmann, 2007). Actualmente se pueden distinguir tres tipos de micromatrices de DNA según la naturaleza de las sondas y las técnicas de hibridación utilizadas: a) productos de PCR y b) oligonucleótidos largos (50-70 bases), ambos hibridados con dos poblaciones de cDNA, marcadas diferencialmente, que derivan de dos condiciones experimentales (por ejemplo, muestra problema y muestra control) y c) oligonucleótidos cortos (25 bases) sintetizados *in situ* e hibridados con una única población de cDNA (Busch y Lohmann, 2007). Las micromatrices basadas en productos de PCR han sido muy utilizadas debido a su flexibilidad y a su moderado coste de fabricación (Busch y Lohmann, 2007). Estas micromatrices se generan a partir de genotecas de cDNA por lo que, el hecho de que en la última década se hayan creado numerosas colecciones de clones de cDNA en plantas ha permitido el desarrollo de este tipo de micromatrices, sobre todo en especies de interés agronómico como el tomate (Alba *et al.*, 2005). Una limitación importante de este tipo de micromatrices es que las diferentes sondas de la micromatriz presentan, con frecuencia, secuencias de DNA similares, lo que conlleva problemas de hibridación cruzada (Alba *et al.*, 2004). Las micromatrices de oligonucleótidos largos contienen un conjunto estandarizado de sondas de unas 60 bases diseñadas para representar genes únicos, minimizando el problema de la hibridación cruzada. Las principales limitaciones de estas micromatrices son la complejidad del proceso del diseño de los oligonucleótidos y el coste derivado de la síntesis de los mismos (Alba *et al.*, 2004). Las micromatrices de oligonucleótidos cortos sintetizados *in situ*, contienen conjuntos de oligonucleótidos de 25 bases de longitud sintetizados mediante fotolitografía.

El análisis de la expresión génica mediante micromatrices en plantas de interés agronómico permite identificar conjuntos de genes cuya expresión está correlacionada con la característica agronómica de interés estudiada. En la presente Tesis doctoral

hemos utilizado la micromatriz TOM2, de oligonucleótidos largos, que nos ha permitido estudiar la expresión de 11.862 unigenes de tomate.

6.3. Aproximación genómico-funcional al desarrollo del fruto de tomate

La etapa más estudiada del desarrollo del fruto ha sido la maduración, ya que, en este momento se producen un gran número de cambios químicos y estructurales que determinan el aroma, color, textura y composición bioquímica final del fruto (Gillaspy *et al.*, 1993). Cada una de estas características organolépticas es producto de modificaciones celulares y bioquímicas diferentes. El estudio de la expresión de los genes involucrados en la maduración del fruto de tomate ha sido abordado mediante análisis genómicos utilizando librerías de ESTs (Fei *et al.*, 2004), micromatrices (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005; Carrari *et al.*, 2006) y, mediante análisis proteómicos (Faurobert *et al.*, 2007).

En los análisis de micromatrices se han comparado frutos en distintas etapas de la maduración, a los 8, 12 y 15 días después de la antesis (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005) o librerías de ESTs obtenidas a partir de frutos en estadio verde y en rojo maduro (Fei *et al.*, 2004). Estos autores observaron la inducción de proteínas relacionadas con la biosíntesis y modificación de la pared celular, tales como pectinesterasas, poligalacturonasas, glucanasas, pectato liasas, inhibidores de poligalacturonasas y expansinas, las cuales juegan un papel significativo en la textura del fruto. Además, se han observado cambios en los niveles de transcritos de genes implicados en procesos como la fotosíntesis, el metabolismo de azúcares, el metabolismo de aminoácidos y hormonas. Lemaire-Chamley *et al.*, 2005 describen cómo en el tejido locular del fruto existe una elevada expresión de genes con homología a IAA amidohidrolasas, proteínas de transporte de auxinas (PIN-like) y proteínas de respuesta a auxinas (Aux/IAA). Por otra parte, Fei *et al.*, 2004 han descrito diversos factores de transcripción, pertenecientes a familias como EREBP y MADS-box, que se expresan diferencialmente a lo largo de la maduración del fruto.

Faurobert *et al.*, 2007 han correlacionado los cambios a nivel protéico que tienen lugar en diferentes estadios de desarrollo del fruto (fase de división celular, fase de expansión celular y fruto maduro). En el primer estadio, se observan cambios relacionados con el metabolismo de aminoácidos y la síntesis de proteínas; en el segundo estadio se observan cambios relacionados con la fotosíntesis y con la biosíntesis y modificación de la pared celular. En el último estadio se observa un aumento de expresión de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (Faurobert *et al.*, 2007).

También se han llevado a cabo análisis transcriptómicos y metabolómicos con frutos, en estadio pintón, de plantas transgénicas de tomate que expresan genes de síntesis (*iaaM*) o de respuesta a auxinas (*rolB*) (Martinelli *et al.*, 2009). Estos autores describen que la mayor cantidad de genes que han mostrado expresión diferencial corresponden a categorías funcionales como síntesis y modificación de la pared celular, respuesta a hormonas (principalmente auxinas), metabolismo de azúcares y metabolismo de lípidos.

Por otra parte, el estudio de la expresión de genes implicados en diversos estadios del desarrollo de la flor y estadios más tempranos del desarrollo del fruto también ha sido abordado mediante el análisis con micromatrices. Xiao *et al.*, 2009 han analizado los niveles de transcritos en frutos de *Solanum pimpinellifolium*, en tres etapas del desarrollo de la flor y del fruto: 10 días antes de antesis, antesis y 5 días después de antesis. En los tres estadios de desarrollo estudiados se observa expresión diferencial de genes de identidad de órgano flora de clase B, C y E, tales como *TAP3*, *TAG1* y *TM29*, respectivamente. También se expresan diferencialmente genes relacionados con auxinas, tanto implicados en la formación de conjugados de auxinas (*GH3*), como genes de respuesta a auxinas (*ARF4*, *ARF8* y *ARF9*) y genes con homología a proteínas transportadoras de auxinas (*AUX1*, *PIN4*). También han descrito genes relacionados con GAs, algunos de ellos más abundantes 5 días después de antesis (*AtKAO2*) y otros, más abundantes en los estadios más tempranos (*SIGA2ox2* y miembros de la familia *GASA/GAST1/Snakin*).

Pascual *et al.*, 2009 han comparado el transcriptoma del genotipo UC82 de tomate y el mutante partenocárpico *pat-3/pat4*, en 4 estadios de desarrollo (yema floral, pre-antesis, antesis y 3 días después de antesis). Estos autores describen que los principales cambios transcripcionales que se producen entre un genotipo y otro tienen lugar en el estadio de antesis. En ese momento, a diferencia de lo que ocurre en los ovarios silvestres, en los ovarios de los mutantes *pat-3/pat4* siguen activos un gran número de genes relacionados con el ciclo celular. Además, en el mutante partenocárpico, también se observa un elevado número de genes activados relacionados con la síntesis de GAs y etileno, así como con la señalización y respuesta a auxinas (Pascual *et al.*, 2009).

II. Objetivos



II. OBJETIVOS

En tomate, en ausencia de polinización y fecundación se pueden obtener frutos partenocárpicos. En la presente Tesis doctoral pretendemos producir frutos partenocárpicos de tomate mediante ingeniería genética. Para ello, introduciremos la construcción *PsEND1::barnasa* en diferentes cultivares de interés agronómico-comercial con objeto de producir androesterilidad e inducir la formación de frutos partenocárpicos en las plantas transgénicas obtenidas. A continuación, estudiaremos la calidad de los frutos partenocárpicos obtenidos en comparación con los frutos silvestres.

Por último, estudiaremos las bases genético-moleculares del desarrollo partenocárpico del ovario asociado a la androesterilidad de las plantas *PsEND1::barnasa* en esta especie.

En concreto, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Introducción de la construcción quimérica *PsEND1::barnasa* en plantas de tomate de los cultivares p73 y Moneymaker.
2. Evaluación de las plantas transgénicas androestériles generadas y selección del material de interés agronómico en condiciones de invernadero.
3. Evaluación de parámetros de calidad (tanto físicos como del fruto procesado) de los frutos partenocárpicos *PsEND1::barnasa*.
4. Micropropagación clonal de los genotipos de interés agronómico seleccionados.
5. Estudio transcriptómico global de los ovarios *PsEND1::barnasa* y silvestres en distintos estadios del desarrollo temprano.
6. Análisis de expresión de genes relacionados con el metabolismo, señalización y respuesta de GAs y auxinas.

III. Materiales y Métodos



III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal y su manipulación

En el presente trabajo se han utilizado los cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Micro-Tom, p73 y Moneymaker.

1.1. Material vegetal

Los cultivares p73 y Moneymaker son líneas de tomate comerciales para consumo en fresco de crecimiento indeterminado. El cultivar Micro-Tom es un cultivar ornamental (Scott y Harbough, 1989) de crecimiento determinado.

También se han utilizado diferentes líneas transgénicas *PsEND1::barnasa* de Micro-Tom (MT TR 1d, MT TR 1f, MT TR 9L y MT TR 15e) obtenidas previamente en el laboratorio (Roque *et al.*, 2007) así como líneas transgénicas *PsEND1::barnasa* de los cvs. p73 y Moneymaker obtenidas en la presente tesis doctoral.

1.2. Condiciones de cultivo

Las semillas se sembraron en invernadero, cuando germinaron y presentaron los cotiledones y el primer par de hojas verdaderas, las plantas se transplantaron a macetas de diferente tamaño (dependiendo del porte del cultivar en cuestión). Como sustrato se utilizó fibra de coco y las necesidades de riego se cubrieron mediante fertirrigación con solución nutritiva (Tabla 4), colocando 2-3 goteros por maceta (dependiendo del tamaño de las mismas) y dando 2 riegos diarios.

Tabla 4. Composición de la solución nutritiva suministrada mediante el agua de riego.

PRODUCTO	DOSIS (g/L)
PO ₄ H ₃	0,15
Ca(NO ₃) ₂	0,82
NO ₃ K	0,2
SO ₄ K ₂	0,35
SO ₄ Mg	0,24
BMX (Micronutrientes)	0,1

Las condiciones de temperatura se controlaron por un sistema de calefacción y aire acondicionado que mantenía la temperatura dentro de un rango de 24°C ± 2°C durante

el día y de 20°C ± 2°C durante la noche. La humedad relativa osciló entre 45-65% (diurna) y 75-90% (nocturna). La luz natural se suplementó con luz artificial mediante lámparas de vapor de mercurio de 400 w, para mantener un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad).

La poda se realizó a una sola guía, eliminando todos los brotes laterales y dejando únicamente el tallo principal, aproximadamente cada 15 días.

Por último destacar que se han realizado tratamientos fitosanitarios semanales contra ácaros, mosca blanca y *Liriomyza*.

1.3. Polinización cruzada

La polinización cruzada se realizó sobre plantas estériles masculinas de tomate (*PsEND1::barnasa*) con objeto de mantener las líneas que por si mismas no podían reproducirse. El procedimiento consistió en aplicar directamente el polen de la flor donadora (obtenido en el estadio en que las anteras están dehiscentes) sobre el estigma del carpelo de la flor receptora (madre).

En las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* que presentaban un fenotipo severo de malformación en las anteras no fue necesario emasculación la flor receptora dos días antes de antesis; mientras que en aquellas plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* del cv. Micro-Tom en las que el fenotipo de malformación de las anteras fue leve o medio se emasculó la flor receptora dos días antes de antesis (para evitar la autofecundación).

1.4. Recolección de ovarios en diferentes estadios de desarrollo floral

El estadio de desarrollo de los ovarios se determinó de acuerdo con Brukin *et al.*, 2003. Se recogieron y estudiaron ovarios en 5 estadios de desarrollo, clasificados según el tamaño, aspecto y días respecto a la antesis de los mismos.

Los ovarios de 5-7 días antes de antesis (estadio 1) corresponden al estadio de yema floral temprana (FB); presentaban entre 4-6 mm de longitud, el cáliz comenzaba a abrirse por la parte apical para dejar al descubierto los pétalos (Figura 7)

Los ovarios de 3-4 días antes de antesis (estadio 2) corresponden al estadio de yema floral tardía (FB+). Presentaban entre 7-7,5 mm de longitud; la corola, que mostraba un color entre verde y amarillo, comenzaban a aparecer por encima de los sépalos (Figura 7)

Los ovarios de 1-2 días antes de antesis (estadio 3) corresponden al estadio intermedio entre yema floral y antesis (PR), denominado preantesis; en este estadio,

las yemas florales alcanzaban una longitud de aproximadamente 8-9 mm, la corola comenzaba a abrirse dejando al descubierto el cono estaminal (Figura 7).

Los ovarios en antesis (A) (estadio 4) correspondían a la flor abierta, en la que los pétalos se encontraban completamente expandidos (alcanzando su máximo tamaño), presentaban color amarillo y una longitud aproximada de 10 mm (Figura 7).

Los ovarios de 1-4 días después de antesis (PA) (estadio 5) correspondían a flores que mostraban el mismo tamaño que las flores en antesis, pero, a diferencia de éstas, sus pétalos comenzaban a senescer empezando a perder el color amarillo característico (Figura 7).

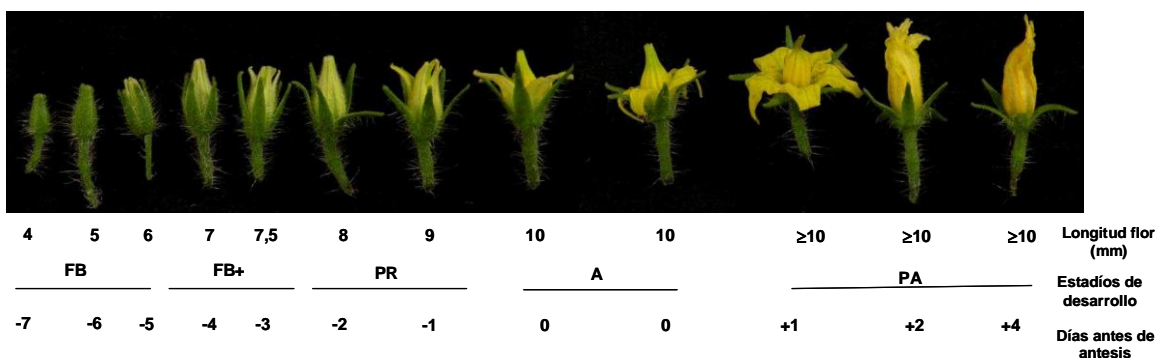


Figura 7. Estadios del desarrollo floral de *Solanum lycopersicum*. En la imagen se muestran los estadios de desarrollo de la flor, la longitud de la misma y los días respecto a la antesis. Los estadios utilizados en nuestro estudio están comprendidos entre el de yema floral temprana (5-7 días antes de la antesis) hasta 1-4 días después de antesis. Siendo (FB) yema floral temprana, (FB+) yema floral tardía, (PR) pre-antesis, (A) antesis y (PA) días después de antesis.

1.5. Tratamientos hormonales

Los tratamientos hormonales se realizaron sobre ovarios de plantas del cv. Micro-Tom. Se utilizaron flores a partir del segundo racimo, dejándose tres o cuatro racimos florales (se eliminó el resto de racimos de la planta) y 3 ovarios por racimo. Cada tratamiento se llevó a cabo en cinco plantas, por lo que, como mínimo se utilizaron 45 ovarios por tratamiento. Los frutos procedentes de ovarios tratados de todas las plantas se recogieron 20 días después de la aplicación hormonal.

Los tratamientos con ácido giberélico (GA₃) (Duchefa) se realizaron mediante 3 aplicaciones, dejando un intervalo de 3 días entre cada aplicación sobre ovarios en antesis no polinizados, pertenecientes a flores emasculadas 2 días antes de antesis.

La aplicación de GA₃ se realizó sobre cada ovario utilizando 10 µL de una solución de 3 x 10⁻⁴ M GA₃ en metanol al 10 % y Tween 80 al 1%. Los ovarios utilizados como control se trataron con una solución de metanol al 10 % y Tween 80 al 1%.

La aplicación del paclobutrazol (PCB) (Duchefa), un inhibidor de la biosíntesis de GAs, se inició cuando las plantas empezaron a desarrollar la primera hoja verdadera (10-12 días de edad). Se realizaron 3 aplicaciones mediante riego con una concentración de PCB de 10^{-5} M; entre una aplicación y otra se dejaron 3 días de diferencia.

1.6. Preparación de muestras vegetales para microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido

Las muestras vegetales se fijaron introduciéndolas en FAE (3,7% formaldehído, 5% ácido acético y 50% etanol) inmediatamente después de su recolección. Posteriormente se sometieron dos pulsos de vacío, de 5 min cada uno, se les cambió la solución fijadora por una fresca y se mantuvieron en ella entre 4 y 16 h a 4°C. Tras el proceso de fijación, los tejidos se deshidrataron mediante lavados de 30 min en concentraciones crecientes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%); en este momento, las muestras se pueden conservar a 4°C en etanol al 70% indefinidamente. A partir de este momento las muestras sufrieron un proceso diferente en función de si se iban a utilizar para microscopía óptica (en cuyo caso se incluyeron en parafina) ó para microscopía electrónica de barrido.

1.6.1. Microscopía electrónica de barrido

Para el análisis mediante microscopía electrónica de barrido, las muestras en etanol al 70% se introdujeron en etanol al 90% y al 100% sucesivamente. Posteriormente las muestras se desecaron totalmente mediante punto crítico en atmósfera de CO₂ en un aparato secador Polaron E300, y se montaron en portaobjetos metálicos con cinta adhesiva de carbono activado sobre los que fueron orientadas y diseccionados convenientemente con la ayuda de una lupa binocular. Después del montaje, las muestras se recubrieron con un sombreado de partículas de oro-paladio de 200 nm, en atmósfera de argón ionizado, en un Sputter Coater SCD005 (BALTEC).

Las imágenes se obtuvieron mediante el programa Autobeam de la plataforma ISIS (Oxford Instruments), con una velocidad de barrido de 200 s por imagen, en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5410 operando bajo las condiciones de microanálisis de 10 kV y distancia de trabajo de 25 mm.

1.6.2. Microscopía óptica

Para el análisis histológico, las muestras vegetales que se encontraban en etanol al 70%, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos, que se tiñeron con azul de toluidina para ser observados al microscopio.

Inclusión en parafina

Las muestras vegetales sumergidas en etanol al 70% se deshidrataron en concentraciones crecientes de 80%, 96% y 100%. La inclusión en parafina se realizó mediante series de etanol 100% : Histo-Clear, Histo-Clear e Histo-Clear: parafina (Histo-Clear, histological clearing agent, National Diagnostic) durante 4 horas en cada paso, hasta llegar a parafina pura (Paraplast embedding media, Sigma), donde se mantuvieron a 58°C durante 2 días, realizando 3 cambios de parafina por día. En este momento, la parafina con las muestras se vertió en moldes adecuados, almacenándose a 4°C hasta la realización de los cortes.

Cortes histológicos

Las muestras incluidas en parafina se seccionaron en un microtomo rotatorio Microm a un espesor de 8 µm. Los cortes obtenidos se colocaron en un baño de agua a 42°C y se montaron sobre portaobjetos de adhesión, Polysine® (Termo scientific); después se secaron sobre una placa térmica a 40°C durante 16 h.

Tinción con azul de toluidina

Las secciones de tejidos incluidos en parafina, una vez sobre los portas, se desparafinaron en Histo-Clear durante 10 min, y luego se rehidrataron en soluciones decrecientes de etanol/agua (100%, 70%, 50%), durante 1 min en cada una y finalmente se lavaron con agua destilada.

La tinción de las secciones desparafinadas se realizó con azul de toluidina 0,05% en agua, durante 1 min, después se realizó un lavado con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Las observaciones y fotografías se realizaron con un microscopio óptico Eclipse 600 (Nikon).

2. Cepas bacterianas

Las cepas que se emplearon en las transformaciones fueron la DH5α y DH10B de *Escherichia coli* y LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (que deriva de la cepa salvaje Ach5, Hoekema *et al.*, 1983).

2.1. Transformación de cepas bacterianas

La preparación de células competentes de *E. coli* y *A. tumefaciens* para su transformación mediante electroporación se llevó a cabo según el protocolo recomendado por el fabricante del electroporador Gene Pulser System®, BioRad.

Para la electroporación se descongeló en hielo una alícuota de 40 μL de células competentes a las que se añadió 1 μL de vector transformante. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación estéril de 0,1 cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso eléctrico con un aparato Gene Pulser® (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron 200 Ω , 25 μF y 1,8 kV, para *E. coli*, y 400 Ω , 25 μF y 1,8 kV, para *A. tumefaciens*. Después del pulso eléctrico las células se resuspendieron en 1 mL de LB en condiciones estériles y se incubaron 1 h a 37°C y 200 r.p.m. para *E. coli* y 3 h a 28 °C y 200 r.p.m. para *A. tumefaciens*.

La selección de recombinantes bacterianos se llevó a cabo mediante la siembra de las células bacterianas electroporadas en placas con medio LB suplementado con el antibiótico al cual confería resistencia el plásmido en estudio. Los antibióticos utilizados para la selección de recombinantes bacterianos y la concentración a la que fueron usados, aparecen en la Tabla 5. Los cultivos de *E. coli* y *A. tumefaciens* en placas de tipo Petri con medio sólido se incubaron toda la noche en estufa a 37°C y tres días a 28°C, respectivamente.

Tabla 5. Concentraciones ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de los distintos antibióticos utilizados en la selección de colonias bacterianas recombinantes.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicilina	100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	-----
Kanamicina	25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Rifampicina	-----	100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

3. Métodos de biología molecular

3.1. Extracción de ácidos nucleicos

En este apartado se exponen los protocolos de extracción de DNA plasmídico, DNA genómico y RNA.

3.1.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* y *A. tumefaciens*

E. Coli

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina tal como lo describen Sambrook *et al.*, 1989, partiendo de un cultivo de 3 mL crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Las preparaciones de DNA plasmídico a media o gran escala, se realizaron a partir de cultivos, crecidos durante una noche en 100 mL o 500 mL de medio líquido LB suplementado con antibiótico, según el procedimiento de extracción y purificación de DNA plasmídico de los sistemas de Qiagen Plasmid Midi Kit (columnas Qiagen tip-100) y Qiagen Plasmid Maxi Kit (columnas Qiagen tip-500), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

A. tumefaciens

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico de *Agrobacterium* se utilizó el método de la lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, 1989 con ligeras modificaciones. Se partió de un cultivo de 3 mL, crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con el antibiótico correspondiente. El protocolo es el mismo que para *E. coli* pero, como la pureza de la preparación de DNA obtenida por este procedimiento no era suficientemente alta para realizar análisis de restricción del plásmido se utilizó una alícuota de 1 μ L de esta preparación de DNA para retransformar *E. coli*. De los clones transformantes de *E. coli* obtenidos de ese modo, se realizó una nueva preparación de DNA plasmídico que se utilizó para los análisis pertinentes.

3.1.2. Extracción de DNA genómico de tomate

Las extracciones de DNA genómico se realizaron a partir de hojas y brotes jóvenes de acuerdo con el protocolo de extracción descrito por Rogers y Bendich, 1984. El tejido (200-300 mg) se trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. La extracción se realizó a 65°C durante 5 min con tampón CTAB 2X (CTAB 2% p/v, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, PVP 1% p/v). Posteriormente se realizó una extracción con cloroformo:isoamílico (24:1). El sobrenadante resultante se precipitó con 1/10 volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y un volumen de isopropanol frío. Tras una centrifugación el precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en TE salino (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM, NaCl 1M).

El RNA se eliminó con 10 mg/μL de RNAasa A durante 1h a 37°C y se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.

La concentración de DNA se estimó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % con bromuro de etidio (0,5 mg/l), en tampón TBE 1X, al voltaje y tiempo necesarios. Este método consistió en comparar la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalado en el DNA con la fluorescencia de un marcador de DNA de peso molecular y concentración conocida (DNA del fago λ digerido con el enzima de restricción *HindIII*, Gibco).

3.1.3. Extracción de RNA total de ovarios de tomate

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de 100 mg de ovarios de tomate en los estadios de desarrollo descritos anteriormente (Materiales y Métodos 1.4.) con el sistema RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) utilizando los reactivos y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA extraído se estimó cuantificando una alícuota de la muestra en el espectrofotómetro NanoDrop® Spectrophotometer (Nanodrop Technologies) a una longitud de onda de 260 nm y se comprobó su calidad por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.2. Southern blot

3.2.1. Digestión del DNA genómico

Se digirieron 10 μg de DNA genómico en dos pasos con 20 U de las enzimas de restricción seleccionadas (*HindIII*, *EcoRI* y *BamHI*). Primero se añadieron 10 U de cada una de las enzimas seleccionadas y se incubó durante 4 h y, a continuación, se agregaron otras 10 U de las enzimas, incubando las reacciones durante otras 14 h. Para analizar si la digestión había sido completa se cargaron 2 μL de la digestión en un gel de agarosa al 1%.

3.2.2. Electroforesis en gel de agarosa y transferencia a membrana

Una vez comprobado el resultado de la restricción, el volumen completo de digestión se cargó junto con 10 μL de tampón de carga (Ficoll 400 al 5% (p/v) y 2 mg/mL de azul de bromofenol) en un gel de agarosa al 0,7% en tampón TBE 1X.

La electroforesis se realizó a 40 V durante 14 h. Antes de transferir el DNA a membrana de nylon (Hybond®-N+, Amersham Biosciences) el gel se sometió a varios lavados: agua durante 10 min (para eliminar el exceso de bromuro de etidio), HCl 0,25 M (para hidrolizar el DNA), solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 N)

durante 30 min, agua durante 2 min y solución neutralizante (NaCl 1,5 M, Tris.HCl 0,1 M pH 8,0) durante 30 min. El DNA se transfirió por capilaridad (durante toda la noche) desde el gel a una membrana de nylon utilizando tampón SSC 10X de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989. El DNA se fijó a la membrana mediante irradiación ultravioleta utilizando el sistema UV-Stratalinker (Stratagene).

3.2.3. Marcaje de sondas radiactivas

Las sondas se obtuvieron mediante el marcaje de DNA con el sistema "Ready to go" DNA Labelling Beads (Amersham Pharmacia Biotech) basado en el uso de oligonucleótidos al azar que se unen al DNA molde permitiendo la síntesis de la cadena complementaria (Feinberg y Volgelstein, 1983), a partir de 50 ng de cDNA y 50 μ Ci de α -[³²P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez sintetizadas las sondas, se purificaron para eliminar los nucleótidos no incorporados, usando columnas de cromatografía de exclusión molecular Sephadex G50 Quick Spin Columns (Roche Molecular Biochemicals).

3.2.4. Hibridación y autoradiografías

Las membranas se prehibridaron durante 1 h a 65°C con una solución de fosfato sódico 1M pH 7,2, SDS 10% p/v, EDTA 0,5 M (descrita por Church y Gilbert, 1984) y después se hibridaron durante una noche con la misma solución renovada a la que se añadió la sonda radioactiva (previamente desnaturalizada durante 2-3 min a 95°C). Tras la hibridación las membranas se lavaron 2 veces durante 5 y 15 min a 65°C con SSC 2X, SDS 0,1% p/v y un lavado de 15 min con SSC 1X, SDS 0,1% p/v, controlando el proceso con un contador Geiger.

Las membranas hibridadas se expusieron en pantallas intensificadoras con películas de autorradiografía HyperfilmMP (Amersham Pharmacia Biotech) a -80°C y el revelado se realizó con una procesadora automática M-35-x-OMAT (Kodak).

3.3. Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó para detectar la presencia del transgén y del gen marcador *nptII* en plantas transgénicas de tomate a partir de DNA genómico y para amplificar fragmentos de DNA que posteriormente se utilizaron para sintetizar sondas.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 50 μ L, a partir de 50 ng de DNA molde. La mezcla de reacción de PCR contenía 0,4 μ M de

oligonucleótidos específicos para los fragmentos a amplificar (Tabla 6), 5 μ L de dNTPs 2 mM, 5 μ L de tampón de reacción 10X, 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM y 1,25 unidades de “Netzyme DNA polimerase” (N.E.E.D). Las reacciones se desarrollaron en un termociclador Perkin Elmer 2.400 en las siguientes condiciones: una incubación inicial a 94°C 2 min; 30 ciclos de 94°C 30 s; (T)°C 30 s; 72°C 30 s y una incubación final a 72°C durante 10 min.

En cada reacción la temperatura de anillamiento (T) se estimó en función de la T_m (temperatura de fusión estimada) (Tabla 6) de los oligonucleótidos empleados. El tiempo de extensión (T_{ext}) depende de la longitud del fragmento a amplificar; en general se utiliza 1 min por cada kb de producto esperado.

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos, fragmentos a amplificar y tamaño de los amplicones (pb) obtenidos en las amplificaciones por PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)	Fragmentos a amplificar	Amplicón (pb)	T_m (°C)	T (°C)	Text (s)
Ribo III	5´-ACGGACCATTATCAGACCTTTAC-3´	<i>barnasa-barstar</i>	544	70	58	30
Inhi III	5´-CGCAGCCTTCCGCTTTTCGC-3´	<i>barnasa-barstar</i>		74	58	30
nosKanDir	5´-GACAAGCCGTTTTACGTTTG-3´	<i>nptII</i>	583	66	58	30
nosKanRev	5´-GATACTTTCTCGGCAGGAG-3´	<i>nptII</i>		68	58	30

T_m : temperatura de fusión estimada; T: temperatura de anillamiento; Text: tiempo de extensión.

4. Transformación genética de tomate

Las plantas transgénicas se obtuvieron aplicando el método de transformación genética de cotiledones descrito por Ellul *et al.*, 2003, puesto a punto en el laboratorio de Dr. Vicente Moreno, en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de Valencia (IBMCP).

4.1. Construcción utilizada para la transformación genética

Se utilizó la construcción pBI101-*PsEND1::barnasa* diseñada por Roque *et al.*, 2007 que se muestra en la Figura 8. Esta construcción está constituida por el promotor constitutivo de la nopalina sintetasa (nos-pro) fusionado al gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina, el promotor *PsEND1* de guisante, encargado de dirigir la expresión del gen de la *barnasa* (que codifica una ribonucleasa extracelular producida por *Bacillus amyloliquefaciens*) y la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (nos-ter) en los extremo 3´ de ambos genes.

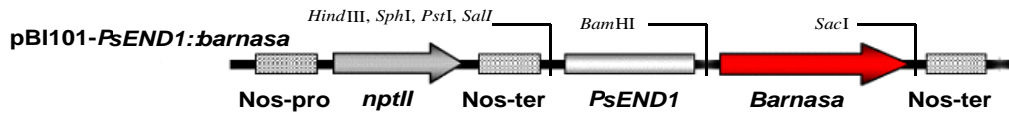


Figura 8. Representación esquemática de la construcción pBI101-PsEND1::barnasa. En la misma se observa el promotor constitutivo de la nopalina sintetasa (nos-pro) fusionado al gen *nptII* (que confiere resistencia a kanamicina), el promotor *PsEND1* encargado de dirigir la expresión del gen *barnasa* y la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (nos-ter).

4.2. Método de transformación

Para la transformación de plantas de tomate se partió de semillas de genotipos silvestres de los cultivares p73 y Moneymaker.

4.2.1. Esterilización de semillas

Las semillas de tomate se pusieron en bolsitas de malla dentro de un bote de cristal de 9 cm de diámetro y 10 cm de altura que contenía agua, dejándose allí durante 30 min. Después, en cabina de flujo laminar, se esterilizaron superficialmente por inmersión durante 30 min, en una solución diluida al 50% de lejía comercial (5% de hipoclorito de sodio). A esta solución se le añadieron 2-4 gotas de detergente 7x-0-matic (Flow laboratories) para mejorar el contacto entre el tejido y el agente desinfectante, ya que, ayuda a romper la tensión superficial de los tejidos. A continuación se eliminó la solución desinfectante mediante 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril (5, 10 y 15 min, respectivamente).

4.2.2. Obtención de plántulas axénicas y extracción de explantes de cotiledón

Tras la desinfección de las semillas, se abrieron las bolsitas que las contenían y se depositaron sobre la superficie del medio de germinación (MG) que estaba contenido en botes de cristal (9 cm de diámetro y 10 cm de altura) con 15 mL de medio. La incubación tuvo lugar durante las primeras 48 h en oscuridad, posteriormente se pasaron a condiciones de fotoperiodo (16 h de luz), temperatura y humedad controladas, con una intensidad luminosa de 2.000 luxes suministrada por una fuente de luz fría y 8 h de oscuridad, temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y HR 70% (durante el período oscuro) y 40% (durante el período luminoso). En estas condiciones, a los 11-

12 días de haber realizado la siembra, las plántulas estaban suficientemente desarrolladas para proceder a la extracción de los explantes de cotiledón.

Una vez separados los dos cotiledones de la plántula, cada uno se dividió en dos segmentos aproximadamente iguales, eliminándose los extremos para incrementar la superficie de infección.

4.2.3. Cultivo de explantes primarios

Los explantes de cotiledón se sembraron en placas de tipo Petri que contenían 30 mL de medio de inducción de organogénesis IK 4,0/4,0 con el envés en contacto con el medio de cultivo sólido. Se colocaron 24 explantes por placa y, con el fin de evitar una evaporación excesiva las placas se sellaron con parafilm. Las condiciones de incubación fueron las mismas que las descritas en el apartado 4.2.2. de Materiales y Métodos.

4.2.4. Preparación del *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación

Para llevar a cabo la transformación genética se utilizó la cepa desarmada LBA 4404 con el vector pBI101 (Figura 8).

El *Agrobacterium tumefaciens* se cultivó a partir de un inóculo glicerinado en medio sólido selectivo LB (Maniatis *et al.*, 1982) suplementado con 100 mg/L de kanamicina. Las colonias que crecieron en este medio se utilizaron de inóculo para el cultivo en medio líquido de la misma composición y se incubaron en oscuridad a 28°C durante 48 h en agitador orbital a 230 r.p.m. Posteriormente las bacterias se cultivaron en medio líquido LB suplementado con 200 µM de acetosyringona (3´5´-dimethoxy-4´-hydroxycetophenone) en agitador orbital a 230 r.p.m., en condiciones de oscuridad, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,2-0,3 (medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm), que correspondía a una concentración de inóculo de 10²-10³ bacterias/mL. La inoculación de los explantes se realizó con el cultivo bacteriano a esta concentración y en fase exponencial de crecimiento.

4.2.5. Cocultivo

Transcurridas las 48 h del cultivo de los explantes primarios éstos se sumergieron durante 6-8 min en el cultivo de *A. tumefaciens*. Tras la inoculación, se secaron los explantes sobre papel de filtro estéril (para eliminar el exceso de bacterias) y, a continuación, se colocaron con el envés en contacto con el medio de cocultivo, IK

4,0/4,0 al que se le añadió acetosyringona esterilizada por microinfiltración (Millipore 0,45 µm) a una concentración final de 200 µM. Los explantes se incubaron con el cultivo bacteriano durante 48 h en estufa de oscuridad a 28°C.

Concluido el período de cocultivo los explantes se transfirieron durante 10-12 min a botes estériles de cristal con aproximadamente 150 mL de medio de lavado (ML) más cefotaxima (500 mg/L). Con este tratamiento se pretendía detener el crecimiento del *Agrobacterium*.

4.2.6. Inducción de organogénesis

Tras el lavado, los explantes se secaron sobre papel de filtro estéril y se colocaron en placas de tipo Petri que contenían medio organogénico sin presión selectiva (IK 4,0/4,0 + cefotaxima 400 mg/L), donde permanecieron 48 h en una cámara de cultivo.

Transcurrido este tiempo los explantes se cultivaron en placas de tipo Petri con medio selectivo de inducción organogénica IKZ 4,0/4,0/1,0 (esta combinación de reguladores en el medio de cultivo permitió la formación de callos que presentaban zonas compactas de color verde en las que se desarrollaban yemas, yemas-ápice y brotes), con 100 mg/L de kanamicina y 400 mg/L de cefotaxima. Los explantes se cultivaron bajo las condiciones estándar de incubación, subcultivándose cada 3 semanas.

Para favorecer el desarrollo de estructuras organogénicas, a las 7-8 semanas de cultivo los callos se separaron del explante eliminando las zonas friables, y se subcultivaron cada 3-4 semanas en el medio de inducción de organogénesis IKZ 4,0/4,0/1,0. Conforme fueron apareciendo los brotes individuales éstos se separaron del callo organogénico y se dispusieron en un medio de enraizamiento (ME) (apartado 5.3. Materiales y Métodos). Las primeras raíces aparecieron aproximadamente a la semana, y, en un mes, el sistema radicular estaba bien desarrollado. En la parte aérea apareció una yema caulinar y varias yemas axilares, a partir de las cuales se pudieron obtener nuevas plantas mediante propagación clonal.

4.2.7. Propagación clonal

El objetivo de la propagación clonal es la obtención de genotipos idénticos al original a través de la multiplicación vegetativa (a partir de las yemas axilares o del meristemo caulinar). Este subcultivo se realizó en el medio de enraizamiento, utilizándose botes altos para favorecer la elongación de los entrenudos.

4.2.8. Aclimatación en condiciones de invernadero

A las 2-3 semanas de la colocación de los brotes en el medio de enraizamiento, las plantas se encontraban en el estadio adecuado para la aclimatación. Las plantas se sacaron de los botes de cultivo y se lavaron las raíces para eliminar los restos de agar, procurando no dañarlas. Después se transplantaron a macetas con fibra de coco (previamente autoclavada) y se cubrieron con vasos de plástico. Transcurridas dos semanas desde su transplante se fue retirando el vaso progresivamente hasta completar su correcta aclimatación.

5. Soluciones minerales, soluciones vitamínicas y medios de cultivo

5.1. Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962)

Macronutrientes	(mg/L)
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170

Micronutrientes	(mg/L)
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

FeNa.EDTA	(mg/L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ .EDTA	37,3

5.2. Solución vitamínica (SH)

Vitaminas	(mg/L)
Rivoflavinas	0,25
Ácido nicotínico	2,5
Tiamina-HCl	10
Piridoxina-HCl	1
Ácido fólico	0,5
Biotina	0,05
D-Pantotenato cálcico	0,5
Colina Clh	0,1
Glicina	0,5
L-Cisteína	1
Ácido málico	10
Ácido ascórbico	0,5

5.3. Medios de cultivo

Medio de germinación (MG)	(g/L)
Solución mineral	MS
Sacarosa (g)	10
Agar (g)	8

Medio de inducción de organogénesis

IKZ 4,0/4,0/1,0	(g/L)
Solución mineral	MS
Sacarosa	30
Myo-inositol	0,1
Tiamina-HCl	0,001
Vitaminas	SH
IAA	0,004
Qinetina (K)	0,004
Zeatina (Z)	0,001
Agar (g)	8

Medio de enraizamiento (ME)	(g/L)
Solución mineral	MS
Sacarosa	20
Myo-inositol	0,1
Tiamina-HCl	0,001
IAA	0,0001
Agar	8

Notas.-

1. El pH del medio se ajustó a 5,7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante.
2. Los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave, a 115°C durante 30 minutos.
3. Las vitaminas se disolvieron en agua; se prepararon soluciones stock concentradas 100x, se almacenaron a -20°C y se añadieron al medio antes de ajustar el pH.
4. La zeatina se añadió estéril por microfiltración en cabina de flujo tras la esterilización del medio de cultivo, a razón de 1 mg/L.

5.4. Medios de cultivo específicos para la transformación genética

Medio LB (Luria-Bertani)	(g/L)
Bactotripton	10
Bacto yeast extract	5
NaCl	10

Medio de lavado (ML)	(g/L)
Solución mineral	MS
Sacarosa	20
Tiamina-HCl	0,001
Myo-inositol	0,1

Medios de cultivo estándar

Etapa del proceso	Medio de cultivo	Antibiótico (mg/L)	
Precultivo	IK (4,0/4,0)	Kanamicina	Cefotaxima
Cocultivo	IK (4,0/4,0) + Acetosiringona (200 µM)		
Lavado	ML		
Cultivo sin presión selectiva	IK (4,0/4,0)		500
Cultivo con presión selectiva	IKZ (4,0/4,0/1,0)	100	400
Enraizamiento	ME	100	

6. Caracterización del material vegetal

6.1. Evaluación del nivel de sensibilidad a kanamicina

El gen bacteriano *nptII* de *Escherichia coli* codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa que inactiva por fosforilación a los antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina, neomicina y gentamicina. Esto hace que la expresión de la construcción quimérica *pnos::nptII::tnos* confiera resistencia a estos antibióticos, que son tóxicos para las células vegetales; por lo que al transferirse con el gen deseado ofrece un método eficaz de selección del material vegetal transformado. La evaluación del grado de inhibición del enraizamiento de los brotes transgénicos se realizó a una concentración de 100 mg/L de kanamicina en el medio de enraizamiento (ME). En ensayos posteriores se utilizaron únicamente las plantas resistentes a la kanamicina.

6.2. Evaluación del nivel de ploidía

La determinación de los niveles de ploidía se realizó por citometría de flujo mediante la cuantificación del contenido de DNA nuclear de las células de hojas jóvenes procedente de transformantes primarios cultivados en medio de enraizamiento con kanamicina, según el método de Smulders *et al.*, 1994.

El tejido se colocó en una placa tipo Petri a la que se han añadido 200 μ L de tampón de extracción de núcleos (Partec) y se troceó finamente. Una vez troceado, el suspendido resultante se pasó a través de una malla de nylon de 50 μ m, y, se le añadieron 800 μ L de una solución colorante que contenía 1 mg/L de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec), consiguiendo así la tinción fluorescente del DNA. El DNA de los núcleos aislados se midió utilizando un citómetro de flujo Partec PAS-II Ploidy Analyser.

El resultado apareció representado en un gráfico que ordenó los datos según el contenido nuclear de DNA (en el eje de abcisas) y contabilizó el número de núcleos de cada tipo (en el eje de ordenadas). Para calibrarlo se utilizó el pico correspondiente a un contenido de DNA igual a 2C (diploide).

6.3. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas (TG1) *PsEND1::barnasa*

El material vegetal utilizado fueron plantas TG1 portadoras del gen de la *barnasa* (plantas con el test de resistencia a kanamicina positivo y PCR positivas), plantas

regeneradas *in vitro* siguiendo todos los pasos del protocolo de transformación genética con la excepción de la inoculación con *Agrobacterium* (testigos internos de la transformación) y plantas silvestres no transformadas procedentes de semilla (testigos externos de la transformación).

6.3.1. Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo

Para evaluar caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo se realizaron 3 lecturas, a las 8, 13 y 18 semanas tras la aclimatación de las plantas. En la Tabla 8 se muestran los caracteres que se evaluaron en las plantas TG1 *PsEND1::barnasa*, en los testigos internos y en los testigos procedentes de semilla.

cv. Micro-Tom

Se aclimataron, por tandas, 100 plantas pertenecientes a 4 genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa* del cv. Micro-Tom (MT TR 1d, MT TR 1f, MT TR 9L y MT TR 15e). Su aclimatación se acopló con el crecimiento, en invernadero, de plantas silvestres procedentes de semilla (MT). El diseño experimental fue el que se explica a continuación: las plantas se dispusieron en filas, con aproximadamente 26 macetas por fila, alternando 2 plantas transgénicas-2 plantas de semilla y se cultivaron durante 9 meses bajo condiciones de invernadero. En este tiempo se evaluaron caracteres reproductivos (morfología de las flores, de las anteras y de los granos de polen), la producción y diversos caracteres de calidad de fruto.

cv. p73

Se aclimataron, por tandas, 40 plantas pertenecientes a 4 genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa* del cv. p73 (p73 TR1, p73 TR2, p73 TR4 y p73 TR7), 20 plantas correspondientes a 1 genotipo no transgénico (testigo interno de la transformación, p73 TI) y 40 plantas procedentes de semilla (testigos externos de la transformación, p73). El diseño experimental fue el siguiente: las plantas se dispusieron en filas, con aproximadamente 12 macetas por fila, alternando 2 plantas transgénicas-1 planta testigo interno transformación -2 plantas de semilla y se cultivaron durante 6-9 meses bajo condiciones de invernadero. En este periodo de tiempo se evaluaron, en todos los genotipos, caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo, la producción y la calidad de los frutos.

cv. Moneymaker

En un primer momento se aclimataron 194 plantas pertenecientes a 78 genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa* del cv. Moneymaker (Tabla 7), 14 plantas pertenecientes a 6 genotipos no transgénicos (testigos internos de la transformación, MMK TI) (Tabla 7) y plantas procedentes de semillas (testigos externos de la transformación, MMK).

Tabla 7. Genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa* y testigos internos de la transformación del cv. Moneymaker evaluados en condiciones de invernadero.

Genotipos transgénicos <i>PsEND1::barnasa</i>							
MMK TR 1.1	MMK TR 12.2	MMK TR 18.2	MMK TR 25.1	MMK TR 31.1	MMK TR 40.1	MMK TR 52.1	MMK TR 63.1
MMK TR 4.1	MMK TR 13.1	MMK TR 19.1	MMK TR 25.2	MMK TR 32.1	MMK TR 44.1	MMK TR 52.2	MMK TR 64.1
MMK TR 6.1	MMK TR 13.2	MMK TR 19.2	MMK TR 26.1	MMK TR 33.1	MMK TR 44.2	MMK TR 55.1	MMK TR 65.1
MMK TR 6.2	MMK TR 14.1	MMK TR 20.1	MMK TR 26.2	MMK TR 34.1	MMK TR 45.1	MMK TR 56.1	MMK TR 66.1
MMK TR 7.1	MMK TR 15.1	MMK TR 21.1	MMK TR 27.2	MMK TR 35.1	MMK TR 47.1	MMK TR 57.1	MMK TR 67.1
MMK TR 8.1	MMK TR 16.1	MMK TR 22.1	MMK TR 27.3	MMK TR 36.1	MMK TR 48.1	MMK TR 58.1	MMK TR 67.2
MMK TR 9.1	MMK TR 17.1	MMK TR 22.3	MMK TR 28.1	MMK TR 36.2	MMK TR 48.2	MMK TR 59.1	MMK TR 68.1
MMK TR 10.1	MMK TR 17.2	MMK TR 23.1	MMK TR 29.1	MMK TR 37.1	MMK TR 49.1	MMK TR 60.1	MMK TR 69.1
MMK TR 11.1	MMK TR 17.3	MMK TR 23.2	MMK TR 29.2	MMK TR 38.1	MMK TR 49.2	MMK TR 61.1	
MMK TR 12.1	MMK TR 18.1	MMK TR 24.1	MMK TR 30.1	MMK TR 39.1	MMK TR 51.1	MMK TR 62.1	
Testigos internos de la transformación							
MMK TI 1.1	MMK TI 2.1	MMK TI 3.1	MMK TI 4.1	MMK TI 5.1	MMK TI 6.1		

Las plantas se dispusieron en filas, con aproximadamente 12 macetas por fila, alternando 2 plantas transgénicas -1 planta testigo interno transformación -2 plantas de semilla y se cultivaron durante 6-9 meses bajo condiciones de invernadero. En este periodo de tiempo se evaluaron caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas, la producción y la calidad de los frutos.

Posteriormente, tras observar el comportamiento de los 78 genotipos anteriores se seleccionaron 10 genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa* (MMK TR 26.1, MMK TR 38.1, MMK TR 39.1, MMK TR 40.1, MMK TR 44.1, MMK TR 44.2, MMK TR 48.1, MMK TR 48.2, MMK TR 59.1, MMK TR 67.1) que fueron testados durante dos campañas más en invernadero. Junto con estos 10 genotipos transgénicos seleccionados se aclimataron de nuevo tres genotipos utilizados como testigos internos de la transformación (MMK TI 1.1, MMK TI 4.2 y MMK TI 6.1) y genotipos silvestres para llevar a cabo, de nuevo, evaluaciones fenotípicas.

Tabla 8. Caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo utilizados para fenotipar las plantas *PsEND1::barnasa* y compararlas con los de las plantas silvestres.

CATEGORÍA	CARÁCTER
Desarrollo Vegetativo	Altura total planta
Desarrollo Reproductivo	Tiempo ontogénico de floración (nº total de fitómeros hasta la 1ª inflorescencia)
	Nº de inflorescencias por planta
	Nº de flores por inflorescencia
	Peso total de frutos por planta
	Nº total de frutos por planta

6.3.2. Análisis de viabilidad de los granos de polen de plantas de tomate

Para comprobar la viabilidad de los granos de polen de plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* de tomate se utilizó el método de fijación y tinción de los cromosomas con una solución de acetato de carmín.

Para ello, se presionaron las anteras de cada flor de tomate con el objetivo de que las células sufriesen una separación mecánica. Los granos de polen contenidos en las anteras se colocaron sobre un portaobjetos y se tiñeron con una solución de acetato de carmín. La solución de acetato de carmín se preparó diluyendo 0'5 g de carmín en ácido acético glacial al 45%, y se calentó hasta la ebullición; luego se diluyó 1:1 en glicerol al 30%. Las muestras se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico Eclipse 600 Nikon.

7. Evaluación de las características de calidad de los frutos de plantas transgénicas (TG1) *PsEND1::barnasa*

Los análisis de calidad de los frutos de tomate se realizaron sobre frutos en el estadio de rojo maduro. Para determinar este estadio del fruto, se colocó una etiqueta "in planta" con la fecha correspondiente a cada fruto cuando se convirtió en pintón (cuando aparece el color rojo). A partir de este momento se contaron unos días (7-10 días) para cosecharlo; este tiempo fijó con ayuda de los testigos con el fin de tener el fruto casi o completamente rojo, y, por lo tanto, maduro.

En la Tabla 9 se muestran los caracteres de calidad de fruto evaluados en los genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa*, en los testigos internos y en los genotipos silvestres.

Tabla 9. Caracteres de calidad de fruto evaluados para llevar a cabo el fenotipado de los genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa* y compararlos con los genotipos silvestres.

CATEGORÍA	CARÁCTER
Atributos físicos	Peso medio del fruto
	Altura media del fruto
	Anchura media del fruto
	Diámetro medio de la cicatriz peduncular
	Altura media de los hombros del fruto
	Espesor medio del pericarpo y de la piel
	Nº lóculos del fruto
	Presencia o ausencia de semillas
	Ratio anchura media fruto/altura media fruto
	Atributos fruto procesado
Acide titulable	
Índice de sabor	
Color del fruto	
Compuestos volátiles	
Metabolitos primarios	

Los análisis de calidad de cada uno de los atributos evaluados fueron realizados en los considerando cinco repeticiones (cada fruto constituyó la unidad experimental). Los datos resultantes fueron sometidos a análisis de varianza con el programa estadístico STATGRAPHICS 5.1.

Las pruebas de comparación múltiple de medias se realizaron utilizando la prueba LSD (Least Significant Difference) de Fisher. Con esta prueba podemos calcular la diferencia entre dos medias (después de haber determinado que existen diferencias significativas entre ellas mediante el ANOVA) para todos los posibles pares de medias y compararlas con el margen de error (LSD) asumiendo un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

El peso fue evaluado mediante una balanza analítica, mientras que el resto de atributos físicos cuantitativos se evaluaron mediante un pie de rey (nonius). Para la evaluación de los atributos del fruto procesado se utilizaron diferentes partes del fruto: el jugo del fruto se empleó para evaluar el contenido en sólidos solubles y la acidez titulable, la piel y el pericarpio se utilizaron para evaluar el contenido de compuestos volátiles, el pericarpio (sin piel) se utilizó para analizar los metabolitos primarios y, el puré del fruto de tomate fresco se empleó para evaluar el color.

7.1. Contenido en sólidos solubles

La determinación de los sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) se realizó mediante refractometría, estimando el índice de refracción (IR) con un refractómetro de mano (ATAGO N-14) (Figura 9), el cual compara la velocidad de la luz que pasa a través de un líquido, con la velocidad a la cual pasa a través del aire.



Figura 9. Refractómetro de mano ATAGO

El método consistió en pelar cada fruto, triturarlo y filtrar el triturado con una gasa de tal forma que sólo recogemos fase líquida. A continuación se calibró el refractómetro con agua destilada y, posteriormente se colocó una gota del filtrado de tomate sobre el prisma del refractómetro, se cerró la tapa (de manera que la gota quedó extendida homogéneamente por todo el prisma) y, enfocando el refractómetro hacia un foco de luz, se observó un círculo con una escala cuya parte inferior es de color azul y la superior blanca. El valor que se anotó fue el correspondiente a la división de la escala

más próxima a la línea que separa los dos colores. La unidad de dichas medidas serán los °Brix, equivalentes al porcentaje en sólidos solubles, responsables, en parte, de la calidad organoléptica del fruto.

7.2. Acidez titulable

La determinación de la acidez titulable (AT) se realizó a través de un análisis volumétrico con una solución de NaOH 0,1 N y usando fenolftaleína como indicador. El método consistió en añadir unas 3-4 gotas de fenolftaleína en una solución de 5 mL de filtrado de tomate + 15 mL de agua destilada. En nuestro caso, la solución de filtrado de tomate diluido con fenolftaleína fue incolora, por ser ácida. A continuación se añadió progresivamente NaOH 0,1 N (utilizando bureta), hasta el momento que la solución viró de transparente a rosa. Posteriormente, medimos el volumen final de NaOH 0,1 N utilizado y calculamos el porcentaje de ácido cítrico mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ ácido cítrico} = (V_1 \times N / V_2) \times K \times 100$$

donde:

V₁: volumen de NaOH (0,1 N) consumido (mL)

V₂: volumen de muestra en mL (5 mL)

N: normalidad de NaOH (0,1 meq/mL)

K: peso equivalente del ácido cítrico (0,064 g/meq)

7.3. Índice de sabor

El índice de sabor del tomate (también conocido como índice de madurez) está basado en el contenido de azúcares y de ácidos del fruto (Bisogni *et al.*, 1976, Navez *et al.*, 1999). El índice de sabor se obtuvo de la relación entre los sólidos solubles totales (°Brix) y la acidez titulable (AT), expresándose de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de sabor} = \text{°Brix} / \text{Acidez titulable}$$

7.4. Medición del color por colorimetría

El color es una de las características externas más importantes del fruto de tomate, ya que permite determinar su estado de madurez siendo, por tanto, un factor importante a la hora de ser elegido por el consumidor. En nuestro trabajo se ha determinado el color

de un puré fresco (realizado con la pulpa de frutos pelados y triturados) del fruto de tomate mediante el colorímetro ColorFlex® (HunterLab) (Figura 10), calibrado al comienzo de las mediciones con una cerámica blanca y una negra. El color se expresó utilizando los parámetros L*, a* y b* dentro del espacio de color CIELAB, con un iluminante D65 y observador de 10°.

El parámetro L* define la claridad del fruto, oscilando entre el color blanco y el negro; a* denota el cambio de color de verde a rojo, mientras que b* representa el cambio de color de azul a amarillo (Heilderberg CPS, 1999). Los cambios de color han sido expresados con diferentes combinaciones matemáticas de a*, b* y L* (parámetros CIEL*a*b*) en el plano ecuatorial cromático. Goodenough *et al.*, 1982 y Cantwell, 1998 utilizan sólo a* para expresar los cambios de color, mientras que otros autores prefieren emplear la relación a*/b* como indicador del desarrollo de color en tomate (Babbit *et al.*, 1973, McDonald *et al.*, 1999). A partir de estos parámetros se han obtenido diferentes atributos cromáticos que se calculan de acuerdo con las ecuaciones (1), (2) (López Camelo y Gomez, 2004) y (3) (Yeatman, 1969).

(1) Croma o Saturación: $(a^2 + b^2)^{1/2}$, describe lo llamativo o lo apagado de un color

(2) Tono angular ó Matiz (Hue): $\arctg(b^*/a^*)$. Representa el color actual, es como se percibe el color, se expresa como ángulo y oscila entre 0° (rojo), 90° (amarillo) y hasta 270° (azul).

(3) Índice de color: b^*L/a^* : Esta ecuación define el color de un puré fresco de tomate y se ha utilizado para predecir el color del Ketchup a partir de un puré de tomate fresco (Buck y Sparks, 1952).



Figura 10. Colorímetro (HunterLab) utilizado para medir el color de los frutos.

Con el fin de cuantificar cambios globales de color, se calculó la diferencia de color total (ΔE) entre los frutos de los genotipos transgénicos y los del genotipo silvestre mediante la ecuación (4).

(4) Diferencia de color total: $\Delta E = ((\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2)^{1/2}$

7.5. Análisis de compuestos volátiles mediante GC-MS

Este análisis se realizó en colaboración con el Servicio de Metabolómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de Valencia (IBMCP).

7.5.1. Material vegetal

En el presente análisis se han evaluado 8 genotipos transgénicos independientes (MMK TR 67.1, MMK TR 40.1, MMK TR 48.1, MMK TR 48.2, MMK TR 59.1, MMK TR 26.1, MMK TR 38.1, MMK TR 39.1), 2 genotipos testigos internos de la transformación genética (MMK TI 1.1 y MMK TI 6.1) y el genotipo silvestre (MMK). En total se han estudiado 11 genotipos y 5 frutos de cada uno de ellos (5 réplicas biológicas), por tanto, el análisis constó de 55 muestras.

Todos los frutos de tomate que hemos utilizado en el presente análisis se recolectaron en el estadio de rojo maduro. Los frutos se lavaron con agua y se secaron con papel absorbente (para eliminar los tricomas); después el tomate se cortó longitudinalmente, por la mitad. Una mitad del fruto se utilizó para los análisis de volátiles y, la otra mitad, para los análisis de metabolitos primarios.

En la mitad del fruto que se destinó al análisis de volátiles, se eliminó la placenta y semillas quedándonos sólo con la piel y el pericarpo del mismo, que se congeló en nitrógeno líquido y se trituró hasta conseguir un polvo homogéneo. Este triturado se almacenó posteriormente a -80°C hasta su utilización.

7.5.2. Preparación de las muestras

Se pesaron 500 mg de polvo de tomate congelado en un vial de cristal y se incubaron en un baño de agua con agitación 10 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se adicionaron 0,5 mL de una solución de 100 mM EDTA pH 7,5 y 1,1 g de CaCl₂·2H₂O para frenar las reacciones enzimáticas y se sonicó durante 10 min en un baño de ultrasonidos hasta conseguir que el CaCl₂ se disolviera completamente. Posteriormente, se transfirió 1 mL de la mezcla a un vial de vidrio de espacio de cabeza de 10 mL y se selló con un septum de PTFE/silicona. En este momento, las muestras son estables a temperatura ambiente durante 12 h aproximadamente.

Este procedimiento utilizado es el descrito por Tikunov *et al.*, 2005 con algunas modificaciones.

7.5.3. Separación e identificación: Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza y cromatografía de gases y espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS)

La metodología utilizada para la detección de compuestos volátiles consta de dos fases denominadas fase de adsorción y fase de desorción. La primera consiste en la exposición del soluto volátil de interés a una fibra polimérica. En la segunda, que se realiza en el puerto de inyección de gases, se desorberán los solutos volátiles atrapados en la fibra polimérica para su posterior análisis. La adsorción de los compuestos volátiles se realizó en el espacio de cabeza mediante la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME). Se utilizó una fibra de sílice fundido recubierta con 65 μm PDMS/DVB (Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene) (SUPELCO) adecuada para el robot "Combi-PAL" y para el septum "Merlin Microseal" del inyector. Posteriormente, el vial que contenía la mezcla se atemperó a 50°C durante 10 min y, después, se introdujo la fibra a través del septum exponiéndose, en agitación, al espacio de cabeza durante 20 min. Para la desorción de los analitos, la fibra se introdujo en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a 250°C durante 1 min en modo "splitless". Como gas portador se utilizó el Helio a un flujo de 1,2 mL/minuto. Las condiciones de funcionamiento fueron:

- Columna DB-5 ms (60 m, 0,25 mm, 1 μm)
- Condiciones de temperatura para el horno: 40°C 2 min, rampa 5°C/min hasta alcanzar 180°C, incremento de temperatura de la rampa hasta 250°C y después 4 min a 250°C.
- Los espectros de masa se obtuvieron por impacto electrónico a una energía de ionización de 70 eV. Las muestras se analizaron en el modo "scan" con un rango m/z entre 35-220.

Para la separación e identificación de los compuestos volátiles se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5975B (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), equipado con la misma columna y programado con las mismas condiciones cromatográficas descritas en el apartado anterior. En el equipo estaba incorporado un robot CTC CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland).

La identificación se realizó mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos en las muestras de tomate con los de la biblioteca NIST2005. Paralelamente se compararon los tiempos de retención de los compuestos volátiles detectados en las muestras de tomate con los de sus correspondientes estándares comerciales,

procedentes mayoritariamente de Sigma-Aldrich, salvo el 1-nitro-2-feniletano, que procede de Apin Chemicals.

7.5.4. Cuantificación

Para la cuantificación se integró un ión específico de cada pico y se normalizó con respecto al área total del cromatograma.

7.5.5. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de componentes principales utilizando el programa informático SIMCA-P 11 (Umetrics, Sweden). Los test de significación se llevaron a cabo con Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

7.6. Análisis de metabolitos primarios

Este análisis se realizó en colaboración con el Servicio de Metabolómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de Valencia (IBMCP).

7.6.1. Material vegetal

De los ocho genotipos transgénicos estudiados en el análisis de volátiles se seleccionaron los genotipos transgénicos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 para el análisis de metabolitos primarios. Estos dos genotipos transgénicos se seleccionaron porque su contenido de compuestos volátiles difería más respecto al mostrado por el genotipo silvestre. En este caso, el fruto se pela previamente antes del análisis, por lo que, el puré obtenido consta únicamente del pericarpo del fruto (sin la piel).

7.6.2. Extracción metabolitos

Se homogeneizaron 250 mg de polvo de tomate congelado en 1000 μ L de metanol 100% con 120 μ L de Ribitol (0,2 mg en 1 mL de agua) (Roessner *et al.*, 2000) durante 15 min a 70°C en agitación. Se le añadió 1 volumen de agua centrifugándose 15 min a 2000 r.p.m. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo y se secó en "Speed Vacuum" entre 6-16h.

7.6.3. Derivatización

El residuo resultante se disolvió y derivatizó durante 2h a 37°C en 60 μ L de methoxiamine hydrochloride (30 mg/mL en pyridine). Seguidamente se realizó una

mezcla añadiendo 12 μ L de FAME-mix a 1mL de MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) y se añadieron 120 μ L de la misma a cada muestra, dejándolas incubar 30 min a 37°C.

7.6.4. Detección y separación

El sistema de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) está constituido por un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas Pegasus[®] 4D GC-TOFMS (LECO). El equipo también estaba incorporado un robot CTC CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). Como gas portador se utilizó el Helio a un flujo de 2 mL/minuto

Las condiciones de funcionamiento fueron:

- Columna BPX35 (30 m, 0,32 mm, 0,25 μ m).
- Condiciones de temperatura para el horno: 85°C 2 min, rampa 15°C/min hasta alcanzar 360 °C.
- Los espectros de masa se obtuvieron por impacto electrónico a una energía de ionización de 70 eV. Las muestras se analizaron en el modo “scan” con un rango m/z entre 70-600. La temperatura de la fuente de ionización fue de 200 °C.

7.6.5. Identificación y cuantificación

La identificación se realizó mediante la evaluación de los espectros de masas obtenidos en las muestras de tomate con los el programa LECO CHROMATOF (U. 3.32 optimized for Pegasus with TSD (True Signal Deconvolution[®])). Paralelamente se compararon los tiempos de retención de los metabolitos detectados en las muestras de tomate con los de sus correspondientes estándares comerciales (Roessner *et al.*, 2000).

7.6.6. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de componentes principales utilizando el programa informático SIMCA-P 11 (Umetrics, Sweden). Los test de significación se llevaron a cabo con Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

8. Análisis de la expresión génica mediante micromatrices de DNA

Se han utilizado micromatrices de DNA para estudiar los cambios transcripcionales que tienen lugar en ovarios de plantas silvestres de tomate del cv. Micro-Tom, en diferentes estadios de desarrollo (Materiales y Métodos 1.4.) y compararlos con los cambios transcripcionales que ocurren en ovarios de plantas transgénicas androestériles *PsEND1::barnasa* en los mismos estadios de desarrollo.

8.1. Diseño del experimento con micromatrices

En este trabajo los experimentos se han realizado siguiendo un diseño de referencia (Yang y Speed, 2002). Este diseño consiste en hibridar en una misma micromatriz cada una de las muestras objeto de estudio (muestras problema) frente a la muestra de referencia (que será común para todas las hibridaciones). Las muestras problema fueron en cada caso, RNA procedente de cada uno de los ovarios (silvestres y transgénicos) en cada uno de los estadios de desarrollo estudiados. La muestra de referencia estuvo compuesta por una mezcla equimolar de RNAs amplificados procedentes de cada uno de los estadios de desarrollo de ovarios de plantas silvestres y plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* (Tabla 10).

El valor de expresión para cada punto de la micromatriz resulta de la comparación de la señal fluorométrica de cada muestra problema con respecto a la señal producida por la referencia.

En las hibridaciones, la muestra de referencia común (marcada con uno de los fluoróforos) se hibridó contra cada una de las muestras individuales (marcadas con el fluoróforo contrario) tal y como se muestra en la Figura 11. De cada hibridación se realizaron tres réplicas técnicas en las que se va alternando el fluoróforo (“dye swap”) con el que se marcó la referencia y las muestras; por tanto, en total, se realizaron 30 hibridaciones (Figura 11).

Tabla 10. Muestras problema objeto de estudio en el análisis transcriptómico de los ovarios silvestres y transgénicos en diferentes estadios de desarrollo. MT X (ovarios silvestres en el estadio de desarrollo X) y MT Tr X (ovarios transgénicos en el estadio de desarrollo X)

OVARIOS SILVESTRES (Testigos)	OVARIOS TRANSGÉNICOS (<i>PsEND1::barnasa</i>)
MT 1	MT TR 1
MT 2	MT TR 2
MT 3	MT TR 3
MT 4	MT TR 4
MT 5	MT TR 5

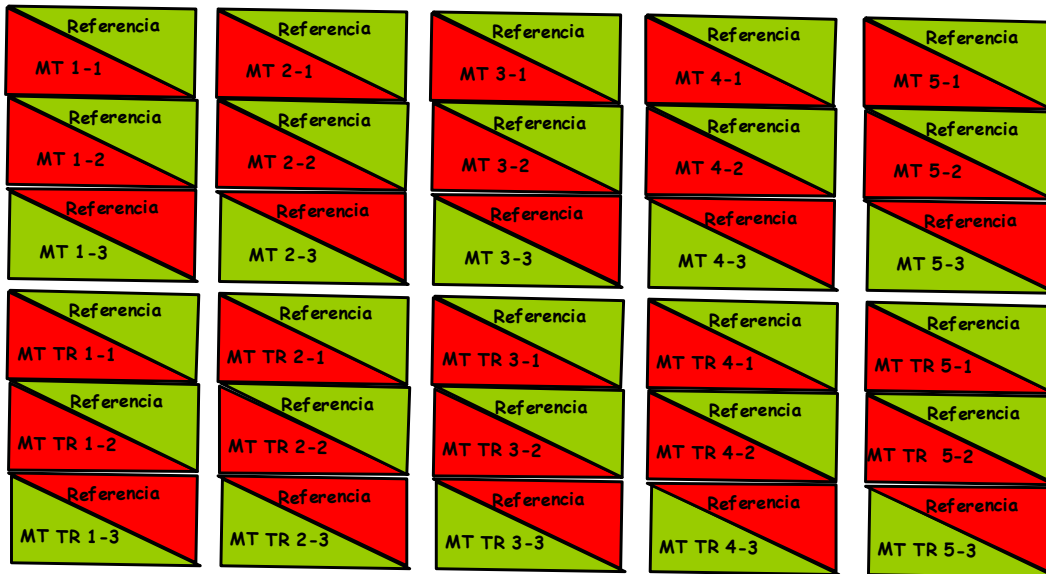


Figura 11. Diseño experimental para el análisis transcriptómico del desarrollo de ovarios silvestres y transgénicos. El RNA amplificado procedente de cada uno de los estadios se marcó con un fluoróforo y se hibridó en la micromatriz junto a la referencia (marcada con el fluoróforo contrario). Para cada muestra problema se realizaron tres réplicas técnicas invirtiendo el orden de los fluoróforos. (MT X-Y: ovarios silvestres en el estadio de desarrollo X, réplica técnica Y; MT TR X-Y: ovarios de plantas *PsEND1::barnasa* en el estadio de desarrollo X, réplica técnica Y) y la referencia.

8.2. Descripción de la micromatriz empleada

Los experimentos de micromatrices se realizaron utilizando la micromatriz de DNA TOM2 generada como resultado del Consorcio Internacional formado por el Dr. Jim Giovannoni (Boyce Thompson Institute for Plant Research, Cornell University, Ithaca, NY, EE.UU), el Dr. Mondher Bouzayen (Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Toulouse, Francia), el Dr. Giovanni Giuliano (Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente (ENEA), Roma, Italia) y el Dr. Antonio Granell (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Valencia, España). Se trata de micromatrices de oligonucleótidos largos (70 mer) generadas en la Universidad de Cornell (<http://www.sgn.cornell.edu>) en las que se hallan depositados oligonucleótidos del conjunto Array Ready Oligo Set (Aros) for the Tomato Genome Version 1,0 (Operon Biotechnologies, Inc).

Estas micromatrices, que están impresas en portaobjetos, contienen 12.160 oligos, incluyendo 300 controles, por lo que, en total se encuentran representados 11.862 unigenes de tomate. Los oligos se diseñaron a partir de las secuencias de la base de datos de unigenes de tomate SGN UniGene *Lycopersicon* Combined Build #3 de la Universidad de Cornell (<http://www.sgn.cornell.edu/index.html>) y en menor medida a

partir de secuencias génicas de transcritos disponibles en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

8.3. Amplificación y marcaje del RNA

El RNA total extraído de todas los ovarios recogidos (Materiales y Métodos 3.1.3.) se amplificó mediante el sistema Amino Allyl MessageAmp[®] II aRNA Kit (Ambion) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante, con algunas modificaciones.

El método se basa en la transcripción inversa del RNA a cDNA de doble cadena y se llevó a cabo en varios pasos. En primer lugar, se realizó la amplificación del RNA para obtener cDNA, para ello, los RNAs de cada una de las muestras se hibridaron con el oligonucleótido T7 oligo (dT) que se unió a las colas poliA de los RNA mensajeros para retrotranscribir la población de RNA mensajeros generando una copia de cDNA. Además este oligonucleótido contiene la secuencia promotora de la RNA polimerasa T7 que permitió transcribir *in vitro* el cDNA, obteniéndose RNA amplificado.

Después, se llevó a cabo una transcripción *in vitro* para obtener gran cantidad de copias de RNA que incorporan nucleótidos UTP modificados con un grupo aminoalil, obteniéndose aminoalil RNA amplificado (aaRNA).

Finalmente, cada muestra de aaRNA se incubó con el éster NHS del fluoróforo Cy3 ó Cy5 (CyTMDye Post-labelling Reactive Dye Pack, Amersham) adecuado, para que se produjeran las reacciones entre los grupos aminoalil y éster.

Resumiendo, 1 µg de RNA de cada una de las muestras se incubó con el T7 oligo (dT) durante 10 min a 70°C para que tuviera lugar el acoplamiento de los oligonucleótidos al RNA mensajero. Después se retrotranscribió a cDNA de cadena simple con el enzima "ArrayScript[®]" a una temperatura de 42°C durante 2 h. A continuación se sintetizó la segunda hebra de cDNA con una DNA polimerasa, durante 2 h a 16°C y se transcribió *in vitro* el cDNA utilizando RNA polimerasa T7 e incorporando UTP modificado con un grupo aminoalil (5-(3-aminoalil)-UTP, aaUTP), durante toda la noche a 37°C.

El aminoalil RNA amplificado (aaRNA) se purificó mediante el sistema Mega Clear (Ambion Inc., Austin, TX, EEUU) y, a continuación se llevó a cabo el marcaje del mismo. El protocolo de marcaje se basa en el propuesto en la página web de TIGR (The Institute for Genomics Research; <http://atarrays.tigr.org/PDF/Aminoallyl.pdf>).

Para cada experimento se marcaron 7,5 µg de aminoalil-RNA amplificado con fluoróforos Cy3 (verde) y Cy5 (rojo), por reacción del grupo aminoalil del UTP con el éster del fluoróforo, durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Tanto la amplificación como el marcaje se cuantificaron determinando así la cantidad de RNA

obtenido y los picomoles de cada fluoróforo por μg de RNA en el NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

8.4. Hibridación de las micromatrices

Se partió de un conjunto de micromatrices impresas en el Servicio de Genómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP).

Las hibridaciones se llevaron a cabo de forma manual utilizando cámaras de hibridación (Telechem Hybridization Chambers) y el protocolo recomendado por Corning para hibridación de UltraGaps Coated Slides (www.corning.com/lifesciences).

En primer lugar, las micromatrices se hidrataron, exponiéndolas 3 veces a vapor de agua a 65°C durante 5 s y a continuación el DNA se entrecruzó al cristal sometiendo a 65 mJ de irradiación ultravioleta en el horno de entrecruzamiento UV Stratlinker 1.800 (Stratagene). Las micromatrices se lavaron dos veces con SDS 0,2% y cuatro veces más con agua MilliQ, secándose por centrifugación a 2.000 r.p.m. Seguidamente se realizó la prehibridación de los portaobjetos en una solución de (SSC 6X, SDS 0,5% y BSA 1%) durante 30 min a 50°C, tras la cual se lavaron 15 s con agua destilada y 2 s con isopropanol.

Los portas se introdujeron en las cámaras de hibridación colocando un cubreobjetos (Erie Scientific) sobre la zona impresa de la micromatriz e inyectando en el espacio que se forma entre ambos 100 μL de una solución de hibridación que contiene formamida desionizada al 50%, SSC 6X, SDS 0,5%, solución Denhardt's 5X y las dos sondas (referencia y problema) previamente desnaturalizadas a 95°C durante 5 min. Las cámaras bien cerradas se sumergieron en un baño a 37°C durante toda la noche.

8.5. Lavado de los cristales

Después de la hibridación, los cristales se sometieron a varios lavados para eliminar restos de mezcla no marcada o no hibridada y restos de la solución de hibridación. Se realizaron diferentes lavados en SSC y SDS en concentraciones decrecientes: primero se utilizó una solución compuesta de SSC 2X y SDS al 0,1% durante 5 min a 42°C; después se realizó un segundo lavado a temperatura ambiente con una solución compuesta por SSC 1X y SDS 0,1% durante 5 min, el tercer lavado se realizó con una solución de SSC 0,1X a temperatura ambiente durante 5 min y, un cuarto lavado, compuesto por SSC 0,05X a temperatura ambiente durante 30 s. Finalmente los cristales se secaron por centrifugación durante 5 min a 2.000 r.p.m.

8.6. Obtención de los datos de las micromatrices

El primer paso en el análisis de los datos es el escaneado de la micromatriz y la extracción de los datos de intensidad de las imágenes.

8.6.1. Exploración y análisis de imagen

Las micromatrices híbridadas se escanearon utilizando un escáner a GenePix 4000B (Molecular Devices) y el programa asociado GenePix 6.0 (Molecular Devices). Para cada micromatriz se capturaron las imágenes de cada fluoróforo por separado, escaneando a 532 nm (Cy3) y 635 nm (Cy5), a una resolución de 10 μm y una potencia de láser del 100%. Los voltajes de los tubos multiplicadores se ajustaron manualmente para minimizar el fondo y reducir el porcentaje de puntos con valores saturados. Este ajuste se consiguió cuando los histogramas de distribución de cada píxel en cada canal se superpusieron, de modo que el cociente entre la señal total de Cy3 y la señal total de Cy5 era, aproximadamente, igual a 1. Las imágenes se guardaron como archivos TIFF multicanal.

El valor de intensidad de cada punto se cuantificó utilizando el programa de análisis de imagen GenePix 6.0. En primer lugar se llevó a cabo el reconocimiento de los puntos, proceso que permitió localizar cada punto de la micromatriz en la imagen obtenida; para ello el fichero GAL (GenePix Array List) o gradilla de reconocimiento específica de la micromatriz TOM2 se superpuso a la imagen. Esta gradilla se genera durante el proceso de impresión de la micromatriz; está organizada por bloques y contiene la información referente a la posición de cada punto, correspondiente a cada uno de los oligonucleótidos y su identificador (ID) único así como su descripción, entre otros campos. Para asegurar un reconocimiento óptimo de los puntos, se realizó un ajuste general de la gradilla de forma automática y un ajuste más preciso de cada bloque de forma manual que permitió marcar los puntos de mala calidad (con partículas de polvo, morfología irregular, con rayas o manchas del tampón), artefactos o defectos en las señales de hibridación, quedando así eliminados para posteriores análisis.

Posteriormente, mediante el algoritmo del "círculo adaptable" (Yang *et al.*, 2001) a cada punto se le aplicó un círculo de diámetro variable (que contenía los píxel que formaban parte de la señal de intensidad) para diferenciar los píxel que formaban parte de la verdadera señal de intensidad de los que constituían la señal de fondo. La estimación de la señal de fondo se realizó mediante el método local que utiliza, para cada punto, la intensidad de los píxel que rodean el círculo establecido mediante el algoritmo del círculo adaptable.

Después se calcularon dos valores de intensidad para cada punto de la micromatriz y para cada canal: la intensidad de la señal expresada como la mediana de la intensidad de los píxel que constituyen la señal (F635Median y F532Median) y la intensidad del fondo expresada como la mediana de la intensidad de los píxel que constituyen el fondo (B635Median y B532Median).

El valor de intensidad neto de cada punto se obtuvo como el cociente entre las intensidades de Cy3/Cy5 tras la sustracción de las respectivas intensidades del fondo local en cada canal. Los datos extraídos durante el análisis de la imagen se pre-procesaron (para excluir los puntos de baja calidad) y normalizaron (para eliminar los errores sistemáticos generados en el proceso). El pre-procesado de los datos consistió en que todos los puntos cuya intensidad neta fue inferior al doble de la mediana del ruido de fondo local en los dos canales, fueron marcados como ausentes y descartados en posteriores análisis.

A continuación, los cocientes de intensidad se transformaron en valores logarítmicos en base 2, ya que esta transformación permite comparar, en la misma escala, los valores de inducción y los de represión.

Después los datos se normalizaron aplicando el método de regresión lineal local Lowess (Yang *et al.*, 2002) que busca corregir efectos técnicos diferenciadores dependientes de intensidad; así, al representar en escala logarítmica los cocientes de señal frente a las intensidades totales tras la normalización lineal, la distribución osciló en torno a 0. Además se aplicó también un filtro que daba por válidos aquellos puntos que superaban los criterios de calidad anteriormente citados en un mínimo del 70% de las micromatrices utilizadas en el experimento.

Los archivos de GenePix 6.0 se importaron al programa de análisis de micromatrices Acuity 4.0. A partir de este momento todos los puntos marcados fueron eliminados y no se tuvieron en cuenta en posteriores análisis.

8.6.2. Análisis estadístico de los datos

Se empleó el análisis estadístico “Significance Analysis of Microarray” (SAM) (Tusher *et al.*, 2001) para la búsqueda de genes con expresión diferencial. Este análisis estadístico se basa en encontrar cambios significativos en conjuntos de datos de gran magnitud, como es el caso de análisis de micromatrices. El método SAM asigna una puntuación a cada gen en base a la magnitud del cambio en los niveles de expresión en relación con la desviación estándar de las réplicas. Se selecciona un umbral de puntuación y sobre los genes que lo superan se calcula el porcentaje de genes hallados por azar, el False Discovery Rate (FDR). El estadístico realiza permutaciones

de medidas repetidas para cada gen para calcular el número de genes hallados por azar (FDR).

Se llevó a cabo un análisis SAM de tipo Two class unpaired (que permitió comparar cada estadio de desarrollo del ovario silvestre con el mismo estadio de desarrollo en el ovario transgénico) introduciendo los valores de los cocientes \log_2 (635/532) de cada una de las tres réplicas de cada estadio de desarrollo y de cada genotipo. Se consideraron genes con expresión diferencial aquellos que resultaron tener un FDR medio menor o igual que 0,05 (Benjamini y Hochberg, 1995).

Por último, como nuestro interés era identificar genes que se inducían o reprimían diferencialmente, se aplicó un filtro por perfiles planos; esto consistió en eliminar todos los genes, que a pesar de haber sido identificados como diferenciales según el análisis SAM, no presentaron un cambio de 1,5 veces inducción o represión en alguno de los estadios estudiados. Se consideraron como genes con expresión diferencial en el proceso estudiado los que superaron todos los cribados descritos.

8.6.3. Análisis de agrupamiento

El conjunto de los unigenes expresados diferencialmente identificados en el presente trabajo se analizó funcionalmente para facilitar la interpretación biológica de los resultados obtenidos. La clasificación funcional de los unigenes se realizó mediante el programa Mapman. La versión disponible de este programa se encuentra en <http://gabi.rzpd.de/projects/Mapman/>.

En el programa Mapman la ontología génica es jerárquica y se basa en agrupaciones denominadas "BIN". Cada BIN engloba los términos que hacen referencia a funciones biológicas similares pudiéndose dividir en subBINs (que corresponden a categorías funcionales englobadas dentro de ella). En comparación con la ontología génica (GO) (Ashburner *et al.*, 2000), con la organización funcional agrupada en BINs se minimiza la redundancia entre categorías funcionales.

Además, el programa Mapman permite la ilustración de los resultados obtenidos en el análisis de micromatrices mediante diagramas y rutas metabólicas que facilitan la detección de cambios en los niveles transcripcionales de los genes (Thimm *et al.*, 2004).

Los unigenes expresados diferencialmente en cada estadio de desarrollo se agruparon también en función de sus perfiles de expresión en grupos SOM (Self-Organizing Maps) (Nikkilä *et al.*, 2002) mediante la aplicación informática Acuity 4.0, utilizando distancias euclídeas como medida de similitud entre genes y centrando los datos.

9. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para la realización de la PCR cuantitativa en tiempo real se emplearon ovarios de plantas Micro-Tom silvestres y *PsEND1::barnasa* en los estadios mencionados anteriormente (Materiales y Métodos 1.4.).

El protocolo de extracción de RNA total se modificó para el análisis mediante q-RT-PCR, incluyendo un paso de eliminación del DNA genómico presente mediante un tratamiento con 4U de rDNAsa I (RNase-free DNase set, QIAGEN) durante 30 min. El cDNA fue obtenido con el sistema SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), partiendo de 3 µg de RNA total. Finalizado este proceso, las muestras de cDNA se diluyeron hasta una concentración de 500 ng/µL.

Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 20 µL, con 3 µL de cDNA (500 ng/ µL), 10 µL de SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) y los dos oligos en una concentración final 0,3 µM cada uno. En la Tabla 11 se muestran los oligonucleótidos utilizados que fueron diseñados utilizando el programa Primer Express v.2.0 (Applied Biosystems).

Las qRT-PCRs se llevaron a cabo en un termociclador 7.500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.com>). El programa consistió en una atemperación de 2 min a 50°C, una desnaturalización de 10 min a 95°C, y 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistía en una desnaturalización de 15 s a 95°C y una elongación de 1 min a 60°C.

Para cada muestra se realizaron tres réplicas técnicas a partir del mismo cDNA. Los resultados se analizaron utilizando el programa 7.500 Real-Time PCR System, Sequence Detection Software (SDS) v.1.3.1 (Applied Biosystems) y los niveles de expresión se calcularon en relación al nivel de expresión del gen “ubiquitin-fusion degradation protein-related” (UB) (SGN-U150644) (Martí *et al.*, 2007), usando el método $\Delta\Delta C_t$ (Applied Biosystems).

Tabla 11. Oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación por qRT-PCR de cDNA de genes de interés. Secuencias de los oligonucleótidos y tamaño del fragmento amplificado por cada pareja de oligonucleótidos (pb).

GEN	OLIGO DIRECTO (Secuencia 5'-3')	OLIGO REVERSO (Secuencia 5'-3')	REFERENCIA	(pb)
SIGA20ox1	5'-CTCATTGTGATCCAACATCATTAAACA-3'	5'-CCATAAATGTGTCGCCTATATTAACC-3'	Martí <i>et al.</i> , 2007	138
SIGA20ox2	5'-AAACCAGATCTTGCGTTAGGAACT-3'	5'-CACTGGTTGTCCATGAAAACCTTGT-3'	Martí <i>et al.</i> , 2007	107
SIGA20ox3	5'-TTGTCCCAAGAAAGATAAGGTGATT-3'	5'-GTTTGTAGGGTGTTTCATATCAGCTCTATAT-3'	Martí <i>et al.</i> , 2007	144
SIGA3ox1	5'-CGCTCTCCTGATGGTGTCCT-3'	5'-TTCAGACCACATGAGCTTCGA-3'	Martí <i>et al.</i> , 2007	75
SIGA3ox2	5'-CGGGTTGTACCCGAGTGTTTC-3'	5'-CCCATATAGATAGGCCACTGAAAGA-3'	Martí <i>et al.</i> , 2007	79
SIGA2ox1	5'-TCACCCCATGCTAGAATTTGTTG-3'	5'-TGGTGTGTAGTGACCAATTCTAAGG-3'	Este trabajo	51
SIGA2ox2	5'-GAAAAAATTGCAGCCTCATAATAATTT-3'	5'-TCCTAACATGGTGGGACTTTGTGC-3'	Este trabajo	70
SIGA2ox3	5'-GCTCTTGCGCTTGGATAAG-3'	5'-AATATTAGTAATATTGTTGATTTGAGGAGGAG-3'	Este trabajo	54
SIGA2ox4	TTACAAGACTAGACTAGCTGATAATAGGTT	CTCAAAGAGTTTAAGTTATATACACCGTTATTATAA	Este trabajo	85
SIGA2ox5	5'-GGAACCTCATAGTGGTTTTTAACGA-3'	5'-TGATAAACTTTAAATTTCTGGCTTTGTCTC-3'	Este trabajo	54
SIIAA3	5'-AAGTTAGCATGGATGGAGCACC-3'	5'-AAACCTGAAGATCAATTTTCCTCAA-3'	Este trabajo	51
SIIAA9	5'-GGCCACCCATTCGATCTTTT-3'	5'-TTCTTCGAGGCAGAGGCTAGA-3'	Este trabajo	52
SIARF7	5'-GCTGACACTGAAACTGATGAGGTC-3'	5'-GACAGGTTGAAGAGTCATCTGAGC-3'	Este trabajo	51
SIARF8	5'-CCCGAGGATGTGCAGAAACT-3'	5'-GCGGTTTAGGGATCCAACCT-3'	Este trabajo	51
Ubiquitina	5'-AAGCAATGGATGCTGAGGCT-3'	5'-GAAGGTGCCGTTGAATGACA-3'	Martí <i>et al.</i> , 2007	141

IV. Resultados



IV. RESULTADOS

1. Obtención de plantas transgénicas androestériles de *Solanum lycopersicum*

La especificidad que confiere el promotor del gen de guisante *PsEND1* para la expresión de genes foráneos en la antera así como su patrón de expresión temporal (Gómez, 2000; Gómez *et al.*, 2004) ofrece la posibilidad de utilizarlo en ensayos de ablación celular de tejidos específicos de la misma. El promotor es capaz de dirigir la expresión de un gen citotóxico (en nuestro caso el que codifica para la ribonucleasa barnasa) a aquellos tejidos donde *PsEND1* es activo, comprobándose que la destrucción de éstos produce esterilidad masculina en aquellas plantas donde dicho gen se expresa.

1.1. Transformación de *Solanum lycopersicum* con la construcción *PsEND1::barnasa*

El promotor *PsEND1* es una herramienta eficaz para la producción de plantas androestériles. Se han obtenido plantas androestériles de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, *Kalanchoe blossfeldiana* y del cv. Micro-Tom de *Solanum lycopersicum* utilizando la secuencia completa del promotor de *PsEND1* (-2736/-6). Éste dirige la expresión específica del gen citotóxico *barnasa* a las anteras de estas plantas (Roque *et al.*, 2007; García-Sogo *et al.*, 2010) (4.1. Materiales y Métodos). Con objeto de estudiar el efecto del promotor *PsEND1* en cultivares de tomate con valor agronómico hemos transformado genéticamente plantas de *Solanum lycopersicum* con la construcción *PsEND1::barnasa*. Los experimentos de transformación genética se realizaron sobre dos cultivares de tomate de crecimiento indeterminado, p73 y Moneymaker. Dichos experimentos se llevaron a cabo mediante cocultivo de explantes cotiledonares con la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y el método de transformación de cotiledones descrito por Ellul *et al.*, 2003. En la transformación se utilizaron, como testigos internos, explantes regenerados mediante cultivo *in vitro* no inoculados con *A. tumefaciens*.

Explantes inoculados con *Agrobacterium tumefaciens*

A las 3 semanas de inoculación empezaron a formarse callos resistentes a la kanamicina en la zona de corte del explante, en el 30% de los explantes. Cinco semanas después de la inoculación, aunque la mayor parte del callo es friable, en un

50-60% de los explantes se distinguían zonas verdes y compactas con estructuras organogénicas (yemas-ápice).

A las 7-8 semanas de cultivo, los callos organogénicos mostraron, en su mayoría, brotes adventicios (Figura 12A). En este estadio se eliminaron las zonas friables o necróticas y se subcultivaron los callos cada 3-4 semanas. A las 9-10 semanas de cultivo casi la totalidad de los callos organogénicos presentaron brotes individuales (Figura 12B), aunque la mayor parte de los ápices se aislaron entre el tercer y quinto subcultivo (12-24 semanas de cultivo).

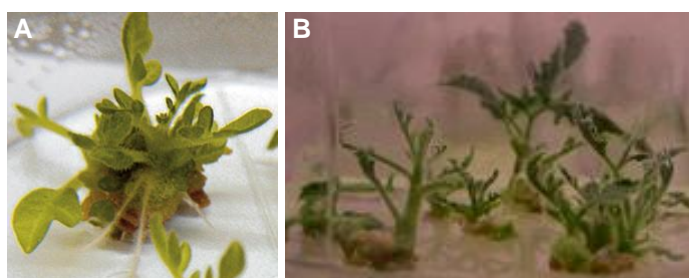


Figura 12. Respuesta organogénica en explantes de cotiledón inoculados (cv. Moneymaker) cultivados en medio organogénico en presencia de kanamicina. (A) A las 8 semanas. (B) A las 12 semanas de cultivo.

Los brotes individualizados en los distintos experimentos de transformación genética se cultivaron en medio de enraizamiento sin antibiótico para permitir la adecuada elongación del tallo y la aparición de un número de yemas axilares suficiente para su propagación clonal. Una vez propagados se evaluó el nivel de sensibilidad a kanamicina de las plantas regeneradas en medio de enraizamiento con este antibiótico (Figura 13).

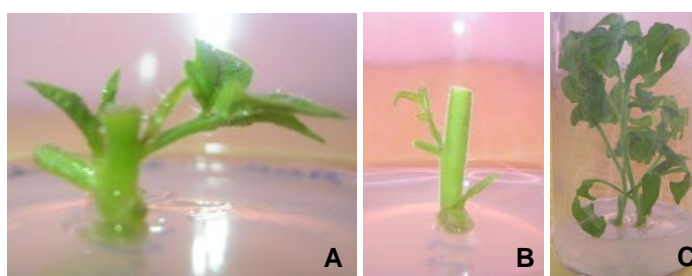


Figura 13. Regeneración *in vitro* de brotes individualizados del cv. Moneymaker. (A y B) Brotes individualizados del cv. Moneymaker en medio de enraizamiento con kanamicina. (C) Planta de tomate enraizada y preparada para su aclimatación en invernadero.

El método de transformación genética que se utilizó permitió la individualización de los ápices regenerados entre las 12 y las 32 semanas de cultivo; este período de

selección largo redujo la posibilidad de regenerar ápices sensibles a kanamicina (falsos transformantes). El porcentaje de callos en los que aparecieron ápices sensibles a kanamicina fue muy bajo; en la transformación del cv. p73, el 5% de los callos formados dieron lugar a plantas sensibles a kanamicina. En la transformación del cv. Moneymaker el 2% de los callos organogénicos generaron plantas sensibles a kanamicina.

Eficacia de la transformación

Las eficacias útiles de las transformaciones fueron del 22%, para el cv. p73 y del 32% para el cv. Moneymaker. Esto indica que, para el primer cultivar se han obtenido 22 plantas transgénicas diploides independientes (procedentes de eventos independientes de transformación) por cada 100 explantes inoculados. Para el cv. Moneymaker obtuvimos un porcentaje de transformación del 32%, esto significa que por cada 100 explantes inoculados, conseguimos tener 32 plantas transgénicas diploides independientes (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados de las transformaciones genéticas de los cultivares p73 y Moneymaker con la construcción *PsEND1::barnasa*. N° de explantes inoculados, n° total de plantas transgénicas, n° y % de plantas diploides obtenidas y % de eficacia útil de transformación.

CULTIVAR	N° EXPLANTES INOCULADOS	N° TOTAL PLANTAS TRANSGÉNICAS (2n+4n)	PLANTAS DIPLOIDES		EFICACIA ÚTIL TRANSFORMACIÓN (%)
			N°	%	
p73	177	66	39	59	22
Moneymaker	300	98	96	98	32

El nivel de ploidía se analizó mediante citometría de flujo en las plantas seleccionadas por su resistencia a kanamicina. Como se muestra en la Tabla 12 el porcentaje de plantas transgénicas diploides fue del 59%, cuando el cv. p73 es el genotipo de partida y del 98% cuando el material de partida es el cv. Moneymaker. En experimentos de transformación genética descritos previamente en la bibliografía con estos y otros cultivares de tomate, se ha visto que la tasa de plantas diploides obtenida es altamente dependiente del genotipo. Además, conviene destacar que en tomate, aproximadamente el 75% de los transformantes primarios tetraploides no tienen semillas y que el 25% restante presentan una producción limitada (Ellul *et al.*, 2003). En nuestro caso, los genotipos tetraploides se eliminaron y no se tuvieron en cuenta para los posteriores análisis.

Los genotipos transgénicos diploides independientes obtenidos fueron caracterizados tanto a nivel molecular (mediante PCR y análisis Southern) como a nivel fenotípico; para ello, se escogieron todas las plantas transgénicas diploides obtenidas para cada

cultivar y, tras ser multiplicadas vegetativamente (*in vitro*) se fueron transfiriendo al invernadero, en tandas, para poder analizar sus características fenotípicas (Figura 14).



Figura 14. Plantas transgénicas del cv. Moneymaker de tomate. (A) Plantas aclimatadas en invernadero. (B) Colección de plantas transgénicas crecidas en condiciones de cultivo *in vitro*. (C) Planta transgénica recién aclimatada (trasladada de la cámara de cultivo *in vitro* a invernadero).

Explantos no inoculados con *Agrobacterium tumefaciens*

En todos los experimentos de transformación se trataron 100 explantes de forma idéntica a los explantes transformados pero omitiendo la inoculación con la solución bacteriana, con objeto de disponer de testigos internos de la transformación. El subcultivo de los cotiledones sin presión selectiva permitió regenerar plantas de tomate no transgénicas (somaclones).

A las 2-3 semanas de cultivo en medio organogénico sin presión selectiva, el 100% de los explantes no inoculados formaron un callo desorganizado en la zona de corte. A las 4-5 semanas de cultivo el 95% de los callos presentan yemas ápice (Figura 15A) y el 50% ápices individuales. Después del primer subcultivo (6-8 semanas de cultivo en medio organogénico) todos los explantes formaron un callo organogénico compacto con brotes adventicios (Figura 15B), individualizándose una media de 2-3 ápices por explante con respuesta organogénica.

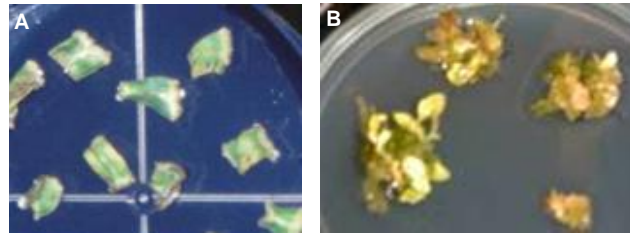


Figura 15. Respuesta organogénica en explantes de cotiledón no inoculados (cv. Moneymaker) cultivados en medio organogénico sin presión de selección. (A) A las 4 semanas. (B) A las 8 semanas de cultivo.

Otro lote de explantes no inoculados se cultivó en medio organogénico selectivo, en presencia de kanamicina, con el fin de comprobar si la concentración de kanamicina utilizada permite una selección adecuada de las células transformadas. A las 3-4 semanas de cultivo ningún explante formó callo en la zona de corte, observándose en muchos de ellos zonas amarillentas (Figura 16A).

A las 6-8 semanas de cultivo todos los explantes se necrosaron (Figura 16B), lo que indicó que la concentración de kanamicina utilizada fue efectiva para inhibir el crecimiento de las células no transformadas.

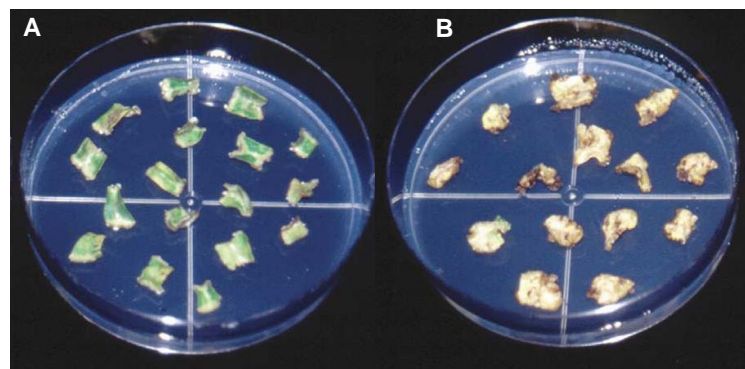


Figura 16. Respuesta de los explantes de cotiledón de tomate (cv. Moneymaker) no inoculados cultivados en medio selectivo en presencia de kanamicina (A) a las 4 semanas y (B) a las 8 semanas de cultivo.

2. Caracterización molecular de las plantas transgénicas (TG1) *PsEND1::barnasa*

2.1. Amplificación fragmento *barnasa* mediante PCR

Con objeto de detectar la presencia del gen marcador *nptII* y del gen de la *barnasa* se ha utilizado la técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en plantas resistentes a kanamicina. Se confirmó que todas las plantas que enraizaban en medio con kanamicina tenían el gen *nptII*, esto indica que la prueba de resistencia a

kanamicina es muy fiable para identificar la presencia del transgén. Este resultado había sido obtenido en los primeros trabajos de transformación genética de tomate, en los que se observó que, al menos un 90% de las plantas kanamicina resistentes eran *nptII* positivas (McCormick *et al.*, 1986; Fillatti *et al.*, 1987). Los resultados del análisis de PCR mostraron también que la tasa de co-integración fue absoluta tanto en la transformación llevada a cabo con el cv. p73 como con el cv. Moneymaker, ya que, el 100% de los transformantes primarios PCR positivos para el gen marcador *nptII* mostraron también el gen de la *barnasa* (Figura 17).

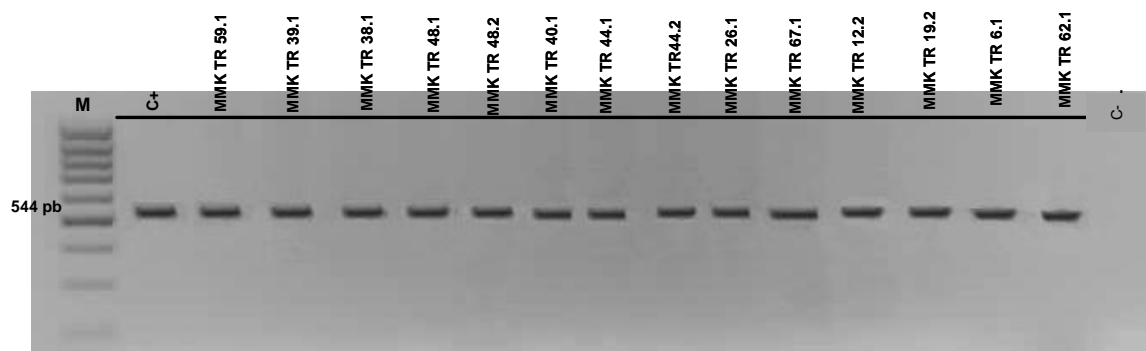


Figura 17. Amplificación del fragmento *barnasa* del genoma de plantas *PsEND1::barnasa* de tomate (cv. Moneymaker). En la parte superior de la figura aparecen los nombres de los distintos genotipos independientes testados por PCR para detectar la presencia del transgén en estudio. Como control positivo (C+) se utilizó la construcción PBI101-*PsEND1::barnasa* y como control negativo (C-) se usó el plásmido PBI101. M: marcador de tamaño (pb).

2.2. Análisis Southern de las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa*

Para determinar el número de copias del transgén que se habían insertado en los diferentes genotipos transgénicos se realizó un análisis Southern con DNA genómico de todos los genotipos transgénicos y genotipos silvestres, utilizando como sonda un fragmento de cDNA correspondiente al gen de la *barnasa*. Las enzimas de restricción elegidas para realizar la digestión del DNA genómico fueron: *HindIII*, *BamHI* y *EcoRI*; ninguna de ellas corta dentro del fragmento *barnasa*; por tanto, los genotipos transgénicos que tengan una copia única del transgén mostrarán una única banda; si tienen dos copias mostrarán dos bandas y así sucesivamente.

Las hibridaciones y los lavados sucesivos se llevaron a cabo a 65°C y, bajo estas condiciones se obtuvieron diferentes patrones de hibridación en el DNA, dependiendo del genotipo ensayado y las enzimas de restricción utilizadas. En la Figura 18 se muestran los resultados del análisis del genotipo transgénico p73 TR1 frente a p73 silvestre. El patrón de bandas obtenido en el genotipo transgénico correspondió a lo

esperado si sólo existe una copia del transgén en el genoma. Este mismo análisis Southern se repitió en las mismas condiciones para todos los genotipos transgénicos seleccionados obteniéndose los resultados que se recogen en la Tabla 13.

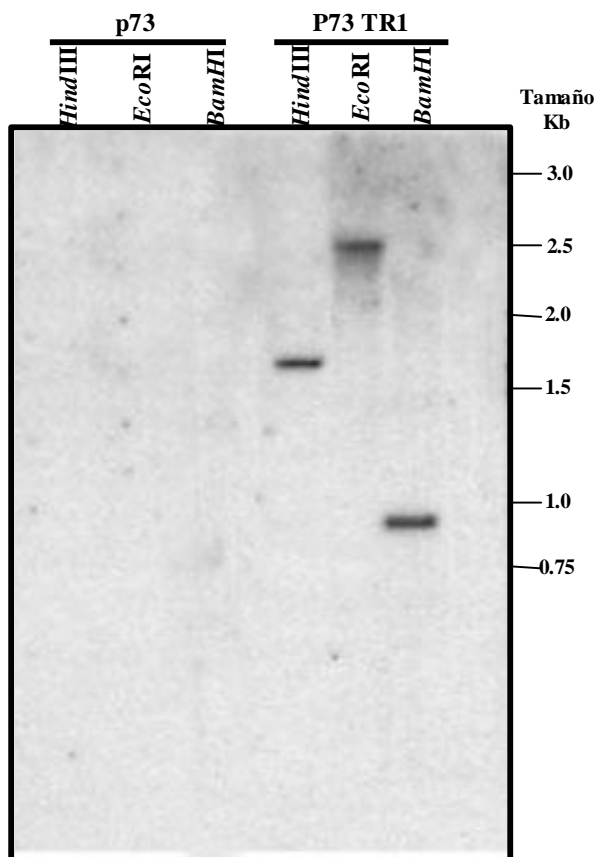


Figura 18. Análisis Southern del genotipo silvestre y del genotipo transgénico p73 TR1 del cv. p73 digerido con *HindIII*, *EcoRI* y *BamHI* e hibridado con cDNA del gen *barnasa*. El tamaño del marcador (Kb) se representa a la derecha de la figura.

Tabla 13. Genotipos, enzimas de restricción y nº de bandas obtenidas en el análisis Southern de los genotipos transgénicos pertenecientes a los tres cultivares estudiados.

GENOTIPO	Nº DE BANDAS			Nº INSERCIONES
	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	
p73 TR1	1	1	1	1
p73 TR2	1	1	1	1
p73 TR4	1	1	1	1
p73 TR7	1	1	1	1
MMK TR 59.1	2	2	2	2
MMK TR 67.1	1	1	1	1
MMK TR 48.1	4	4	4	4
MMK TR 48.2	4	4	4	4
MMK TR 38.1	1	1	1	1
MMK TR 39.1	1	1	1	1
MMK TR 26.1	1	1	1	1
MMK TR 40.1	1	1	1	1
MMK TR 44.1	1	1	1	1
MMK TR 44.2	1	1	1	1
MT TR 1d	1	1	1	1
MT TR 1f	1	1	1	1
MT TR 15e	1	1	1	1
MT TR 9L	1	1	1	1

3. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas (TG1) *PsEND1::barnasa*

El cultivar Micro-Tom es un cultivar enano de tomate con un patrón de crecimiento determinado. El número de frutos por racimo es variable, oscilando entre 15 y 20 frutos; éstos son redondos, con 2-3 lóculos y con un peso comprendido entre 4-7 g (Figura 19A).

El cultivar p73 de tomate presenta un patrón de crecimiento indeterminado. Los frutos, que presentan entre 4-5 lóculos, son generalmente achatados, multiloculares, acostillados (aunque también pueden ser más redondeados) y con hombros (a veces muy marcados) (Figura 19B).

El cultivar MoneyMaker de tomate presenta un patrón de crecimiento indeterminado. Los frutos constituyen una baya de forma redonda, lisa y generalmente sin hombros, aunque algunos frutos pueden presentarlos ligeramente marcados (Figura 19C). Los frutos pueden tener entre 2-3 lóculos, aunque otros algo mayores (pero dentro de este calibre) presentan 3-5 lóculos.



Figura 19. Frutos de tomate de los diferentes cultivares estudiados. (A) cv. Micro-Tom, (B) cv. p73 y (C) cv. Moneymaker.

De entre todos los genotipos transgénicos obtenidos y evaluados para cada uno de los tres cultivares, a continuación sólo se exponen los resultados obtenidos para aquellos genotipos que a lo largo de las diferentes cosechas mostraron características vegetativas, reproductivas (o ambas) con interés desde el punto de vista agronómico.

Las caracterizaciones del desarrollo vegetativo se realizaron en los cultivares con interés comercial (cv. p73 y cv. Moneymaker) a las 8, 13 y 18 semanas de cultivo, mientras que las caracterizaciones del desarrollo reproductivo y de calidad de fruto se realizaron en los tres cultivares (Micro-Tom, p73 y Moneymaker).

Para el cultivar Micro-Tom se evaluaron 4 genotipos transgénicos independientes y un genotipo silvestre. Para el cv. p73, se evaluaron 4 genotipos transgénicos, un genotipo

silvestre y un genotipo utilizado como testigo interno de la transformación (TI). En el caso del cv. Moneymaker, se evaluaron 10 genotipos transgénicos independientes, un genotipo silvestre y tres testigos internos (TI).

3.1. Características del desarrollo vegetativo

Todos los parámetros evaluados fueron sometidos a análisis estadísticos mediante el programa Statgraphics Plus, versión 5.1. Los ensayos realizados fueron: análisis de la varianza (ANOVA) utilizando un nivel de significación del 95%, tablas de comparación de medias y test de rangos múltiples ($p < 0,05$).

3.1.1. Altura de las plantas

Para este carácter no se han observado diferencias significativas entre el genotipo silvestre y los genotipos utilizados como testigos internos en cada uno de los cultivares evaluados.

cv. p73

A las 8, 13 y 18 semanas de cultivo, el 100% de los genotipos transgénicos y el genotipo silvestre presentaron la misma altura (Figura 20A), no existiendo, por tanto, diferencias significativas para este carácter entre los genotipos transgénicos y el silvestre.

cv. Moneymaker

A las 8 y 13 semanas de cultivo los genotipos transgénicos presentaron la misma altura que el genotipo silvestre. En la semana 18 de cultivo se observó que los genotipos silvestres y los genotipos transgénicos MMK TR 38.1 y MMK TR 26.1 no presentaron diferencias significativas respecto al carácter altura de la planta. Sin embargo, el 50% de los genotipos transgénicos presentaron mayor altura que el silvestre (MMK TR 59.1, MMK TR 39.1, MMK TR 48.2, MMK TR 48.1 y MMK TR 67.1) y el 30% de los genotipos transgénicos presentaron menor altura que el silvestre (MMK TR 40.1, MMK TR 44.2 y MMK TR 44.1) (Figura 20B).

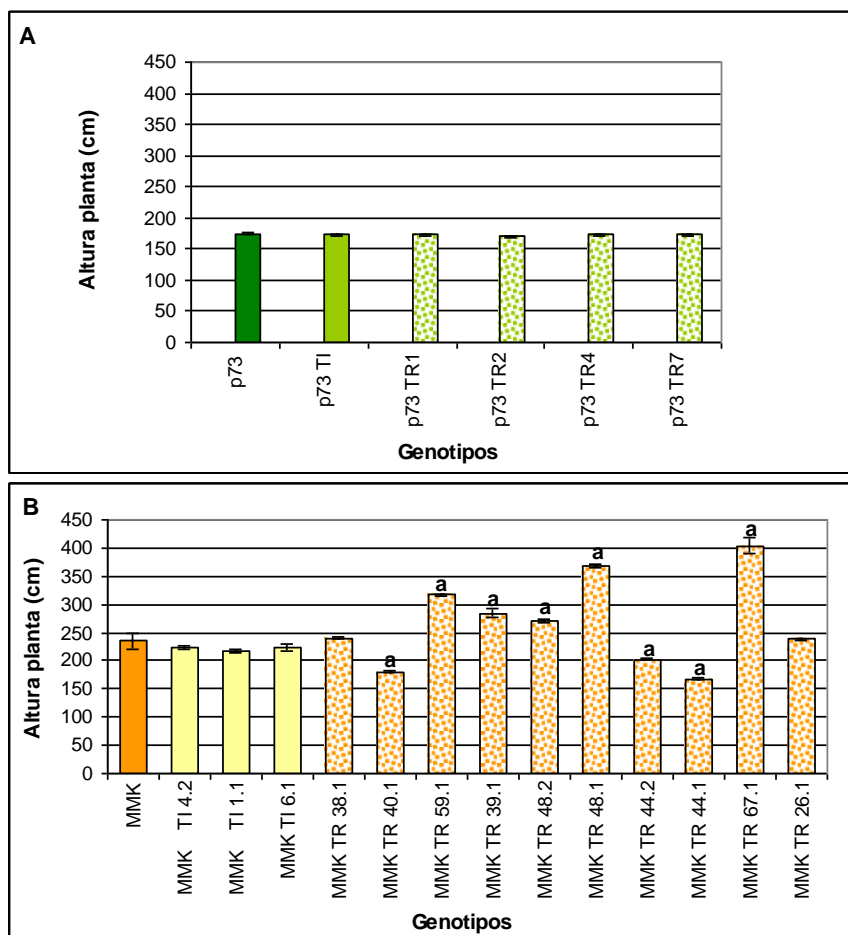


Figura 20. Altura media de las plantas pertenecientes a los genotipos silvestres y transgénicos a las 18 semanas de cultivo. (A) cv. p73 y (B) cv. Moneymaker (MMK). La letra "a" indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas al 95% para los diferentes genotipos transgénicos evaluados comparándolos con sus correspondientes genotipos silvestres. Valores medios y errores estándar.

3.2. Características del desarrollo reproductivo

Respecto al desarrollo reproductivo se evaluaron diferentes caracteres como el tiempo de floración, el número de inflorescencias por planta, el número de flores por inflorescencia y la morfología de la flor, de las anteras y de los granos de polen. Para ninguno de estos caracteres se han observado diferencias significativas entre los testigos internos y sus correspondientes genotipos silvestres.

3.2.1. Tiempo de floración

Se evaluó la posible modificación del tiempo de floración entre las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* y las plantas silvestres, mediante el recuento del número de fitómeros formados desde la base de la planta hasta la primera inflorescencia.

cv. p73

La evaluación del tiempo de floración se realizó a las 8 semanas de cultivo en invernadero. En este momento se observó que en las plantas transgénicas la primera inflorescencia había aparecido entre el 7^o y el 8^o fitómero y en las plantas del genotipo silvestre en el 8^o fitómero; esto indica que no existieron diferencias significativas entre ambos genotipos para este carácter (Figura 21A).

cv. Moneymaker

A las 8 semanas de cultivo en invernadero se observó que en el 50% de los genotipos transgénicos, la primera inflorescencia apareció entre el 6^o y 7^o fitómero mientras que en el genotipo silvestre se desarrolló tras la formación del 8^o fitómero (Figura 21B), lo que podría indicar que en estos genotipos transgénicos existiría un leve adelanto de la floración. En 3 (de los 10) genotipos transgénicos (MMK TR 48.1, MMK TR 48.2 y MMK 44.1) la primera inflorescencia apareció más tarde (sobre el 9^o fitómero) que en el silvestre y sólo en dos genotipos transgénicos (MMK TR 44.2 y MMK TR 26.1) la 1^a inflorescencia apareció sobre el 8^o fitómero, como ocurrió en el genotipo silvestre.

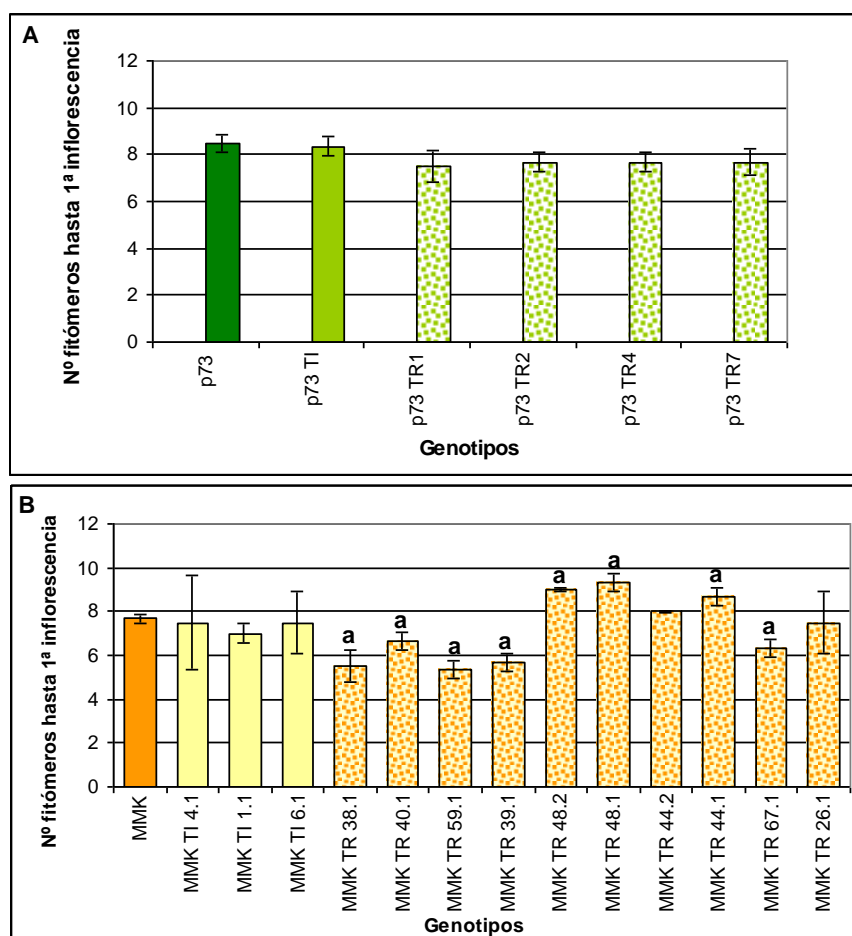


Figura 21. Tiempo ontogénico de floración medido a las 8 semanas de cultivo en invernadero para los genotipos silvestres y transgénicos. (A) cv. p73 y (B) cv. Moneymaker (MMK). La letra "a" indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas al 95% para los diferentes genotipos transgénicos evaluados respecto a sus correspondientes genotipos silvestres. Valores medios y errores estándar.

3.2.2. Número de inflorescencias por planta

La evaluación del número de inflorescencias por planta se llevó a cabo a las 18 semanas de cultivo en el invernadero.

cv. p73

En lo que respecta al número de inflorescencias por planta hemos observado que los genotipos transgénicos no presentaron diferencias significativas frente al genotipo silvestre (Figura 22A).

cv. Moneymaker

En lo que respecta al número de inflorescencias por planta hemos observado que el 60% de los genotipos transgénicos no han mostrado diferencias significativas respecto al genotipo silvestre. El 40% restante presentaron mayor número de inflorescencias que el genotipo silvestre. El número medio de inflorescencias en estas plantas transgénicas osciló entre 10,67 y 11,67, dependiendo del genotipo, mientras que, en las plantas silvestres el número de inflorescencias fue de 9,50 (Figura 22B). Esto significa que la mitad de los genotipos transgénicos presentaron un incremento en el número de inflorescencias por planta comprendido entre el 12,32% y el 22,84% respecto al genotipo silvestre.

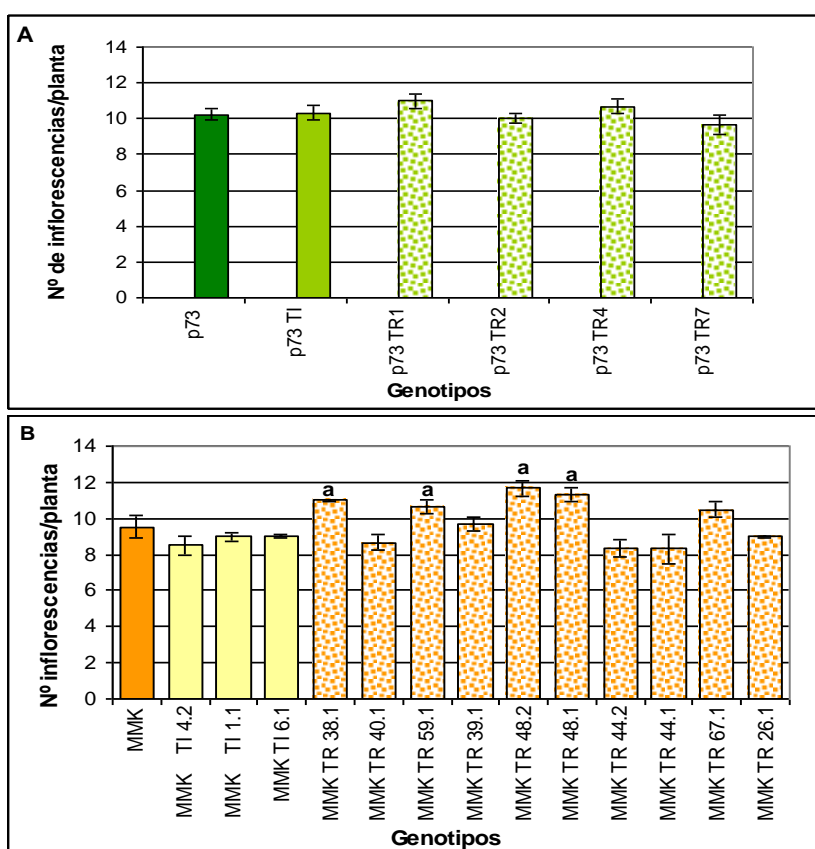


Figura 22. Número de inflorescencias por planta a las 18 semanas de cultivo en invernadero. (A) cv. p73 y (B) cv. Moneymaker (MMK). La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas al 95% para los genotipos transgénicos respecto a sus genotipos silvestres. Valores medios y errores estándar.

3.2.3. Número de flores por inflorescencia

La evaluación del número de flores por inflorescencia se ha llevado a cabo a las 18 semanas de cultivo en invernadero.

cv. p73

Respecto al número total de flores por inflorescencia, el 75% de los genotipos transgénicos evaluados no mostraron diferencias significativas respecto al genotipo silvestre. Cabe mencionar que sólo uno de los genotipos transgénicos (p73 TR1) mostró un incremento del 18,52% respecto a los genotipos silvestres (Figura 23A).

cv. Moneymaker

La evaluación del número de flores por inflorescencia mostró que la mayoría de los genotipos transgénicos (60%) presentaron mayor número de flores por inflorescencia que el genotipo silvestre (Figura 23B). En estos genotipos pudimos contar, en promedio, entre 9-11 flores por inflorescencia (dependiendo del genotipo transgénico). En el genotipo silvestre el número de flores por inflorescencia fue, en promedio, de 8; por tanto, las plantas transgénicas presentaron un incremento de flores por inflorescencia comprendido entre un 12,5% y un 37,5%.

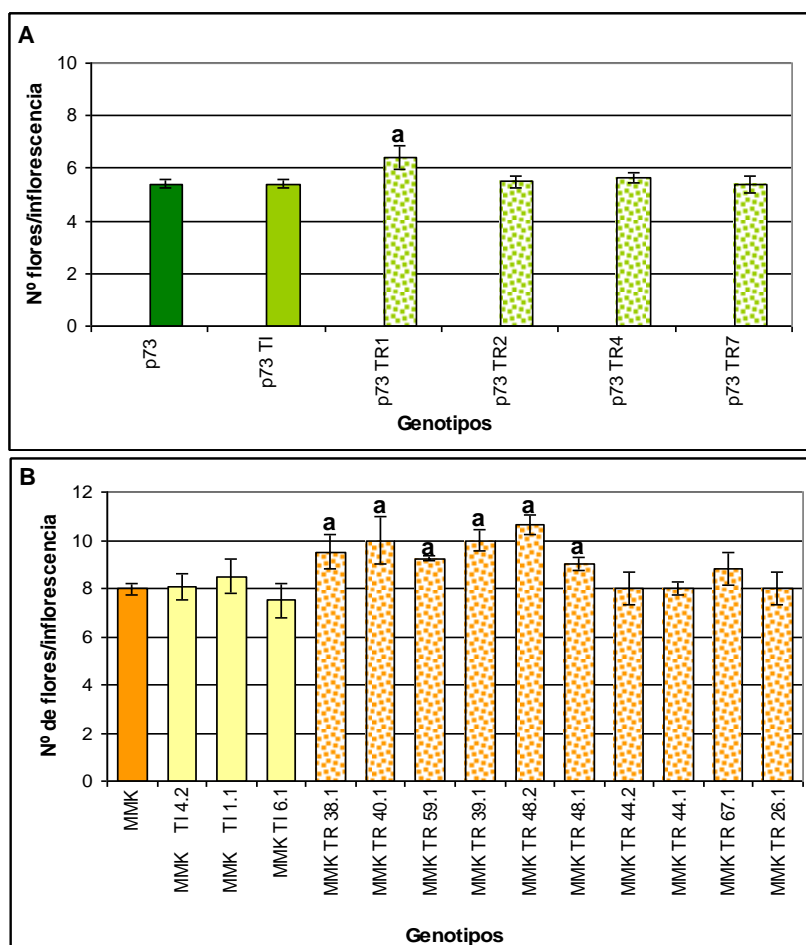


Figura 23. Número de flores por inflorescencia a las 18 semanas de cultivo en invernadero. (A) cv. p73 y (B) cv. Moneymaker (MMK). La letra "a" indica la existencia de diferencias significativas al 95% para los genotipos transgénicos respecto a sus correspondientes genotipos silvestres. Valores medios y errores estándar.

3.2.4. Morfología de la flor

Las plantas transgénicas mostraron un desarrollo similar al de plantas no transformadas crecidas bajo las mismas condiciones. Las flores de las plantas control, al igual que las de las plantas *PsEND1::barnasa*, desarrollaron los órganos característicos de la flor de tomate: cinco sépalos alternando con cinco pétalos, cinco estambres fusionados formando un cono estaminal alrededor de dos carpelos fusionados (que forman un pistilo). Sin embargo, mientras que las cinco anteras de los genotipos silvestres estaban fusionadas formando el cono estaminal característico alrededor del estilo (Figura 24 A, C, F), todos los genotipos transgénicos de los cultivares p73 y Moneymaker mostraron un fenotipo severo de malformación de las anteras (Figura 24 D, E, G, H, I, J, K), ya que éstas estaban atrofiadas dejando el estilo al descubierto. Sin embargo, en los genotipos transgénicos del cv. Micro-Tom, el fenotipo de las anteras variaba entre un genotipo y otro (Roque *et al.*, 2007). Se observaron genotipos transgénicos con anteras muy parecidas a las anteras silvestres (fenotipo leve de malformación); otros mostraban una ligera reducción de su tamaño y una pequeña separación entre ellas (fenotipo medio de malformación) y, otras plantas mostraban anteras atrofiadas que dejaban el estilo al descubierto (fenotipo severo de malformación, Figura 24B)



Figura 24. Fenotipo de flores de tomate de plantas transgénicas *PsEND1::barnasa*. (A) Flor de una planta silvestre del cv. Micro-Tom (MT). (B) Flor de la planta transgénica MT TR 1d del cv. Micro-Tom. (C) Flor de una planta silvestre del cv. p73. (D) Flor de la planta transgénica p73 TR1. (E) Flor de la planta transgénica p73 TR2. (F) Flor de una planta silvestre del cv. Moneymaker (MMK). (G-K) Flores de plantas de 5 genotipos transgénicos independientes (MMK TR 59.1, MMK TR 39.1, MMK TR 48.1, MMK TR 48.2 y MMK TR 26.1). P: pétalos; C: carpelo; St: anteras.

3.2.5. Morfología de las anteras de las plantas *PsEND1::barnasa*.

Para estudiar con más detalle las diferencias morfológicas encontradas en las anteras de los genotipos transgénicos androestériles con las correspondientes anteras de los genotipos silvestres, se llevó a cabo el análisis de las mismas mediante microscopía electrónica de barrido.

Los fenotipos severos de malformación de las anteras fueron similares en todos los genotipos transgénicos de los tres cultivares estudiados. A continuación se muestran imágenes de anteras correspondientes al genotipo MT TR 9L (con fenotipo medio de malformación de las anteras) del cultivar Micro-Tom.

Las anteras silvestres mostraron simetría bilateral constituida por dos pares de tecas; las anteras están perfectamente unidas unas con otras, desde la parte apical (Figura 25A) hasta la parte basal (Figura 25C), formando el cono estaminal característico; destaca la presencia de tricomas abundantes y gruesos que aparecen uniendo dos anteras (se indican con una flecha en la Figura 25E). Las anteras transgénicas se encuentran deformadas y retorcidas, no se han formado las tecas (Figura 25B) y en la base de las mismas se observa cómo existen grandes huecos entre dos anteras contiguas (Figura 25D). Los tricomas existentes son menos abundantes, mucho más finos y largos (flecha en la Figura 25F) y aparecen en menor cantidad que en las anteras de las plantas silvestres.

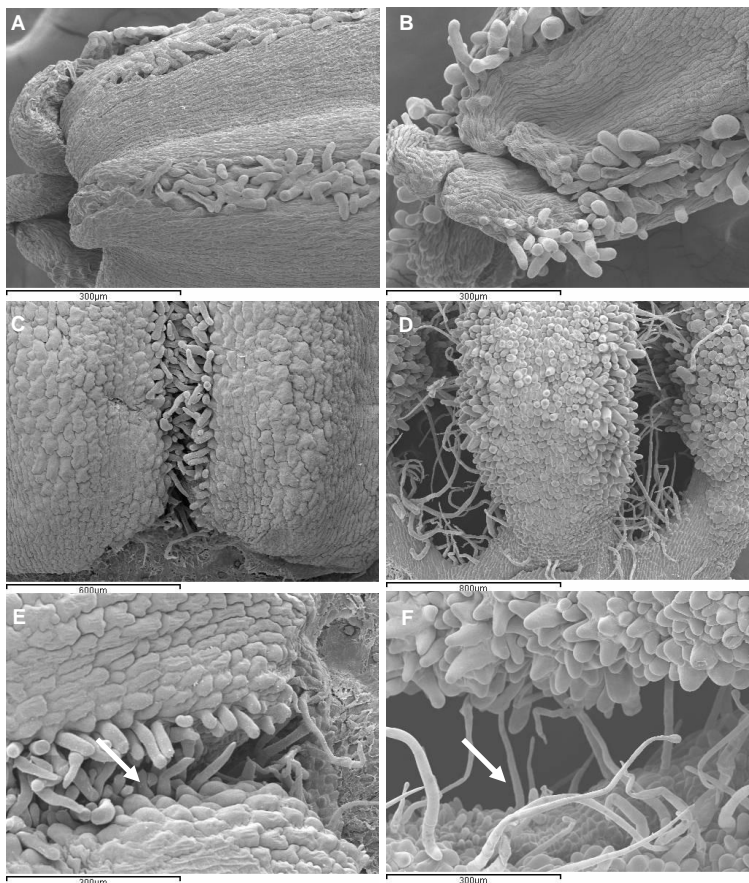


Figura 25. Análisis de las características morfológicas de anteras de plantas silvestres y *PsEND1::barnasa* del cv. Micro-Tom, mediante microscopía electrónica de barrido. (A) Antera silvestre. (B) Antera MT TR 9L. (C) Base del cono estaminal de la antera silvestre; se observan dos anteras unidas mediante tricomas. (D) Base del cono estaminal de una antera *PsEND1::barnasa* en la que se observa cómo existen grandes huecos entre la base de dos anteras. (E) Detalle de los tricomas que cementan dos anteras silvestres contiguas. (F) Detalle de los tricomas que cementan dos anteras *PsEND1:: barnasa* contiguas.

También se encontraron diferencias a nivel celular; observando una antera silvestre en toda su longitud, podemos ver que los tipos celulares que conforman la epidermis presentan forma irregular y su superficie es rugosa (Figura 26A) mientras que los tipos celulares encontrados en la antera transgénica recuerdan a los encontrados en el filamento de una antera silvestre, de forma alargada y sin ornamentaciones (Figura 26B). Además, las células que se observan en la superficie adaxial de las anteras silvestres (Figura 26C) se disponen de manera más organizada que las células que aparecen en la misma zona pero en las anteras transgénicas. (Figura 26D).

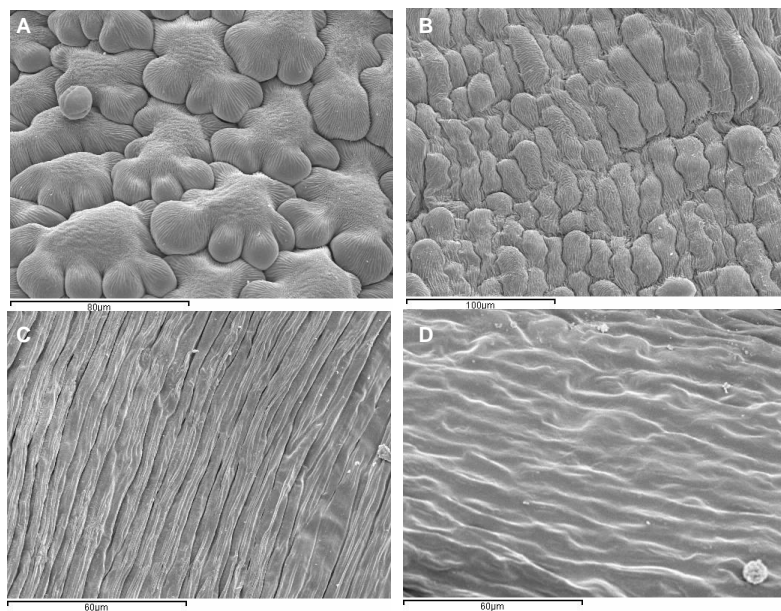


Figura 26. Tipos celulares encontrados en las anteras silvestres y *PsEND1::barnasa* del cv. Micro-Tom. (A) Células de la epidermis de una antera silvestre. (B) Células de la epidermis de una antera *PsEND1:: barnasa*. (C) Tipos celulares que aparecen en la superficie adaxial de las anteras silvestres. (D) Tipos celulares que aparecen en la superficie adaxial de las anteras de plantas *PsEND1:: barnasa*.

3.2.6. Morfología y análisis de viabilidad de los granos de polen

Los genotipos transgénicos de los tres cultivares estudiados con fenotipo severo de malformación de las anteras no presentaban granos de polen en el interior de las mismas. Sin embargo, las anteras transgénicas de fenotipo leve y medio (MT TR 9L) de algunos genotipos del cv. Micro-Tom sí que presentaron polen en el interior de sus sacos polínicos.

Al seccionar los sacos polínicos de las anteras transgénicas con fenotipo medio, se observó que éstas contenían granos de polen, aunque en menor cantidad que los existentes en el interior de las anteras silvestres (Figura 27 A y B). Además, estos granos de polen producidos por las anteras transgénicas aparecen completamente

colapsados (Figura 27 D), a diferencia de lo que ocurre con los granos de polen de las anteras silvestres (Figura 27 C).

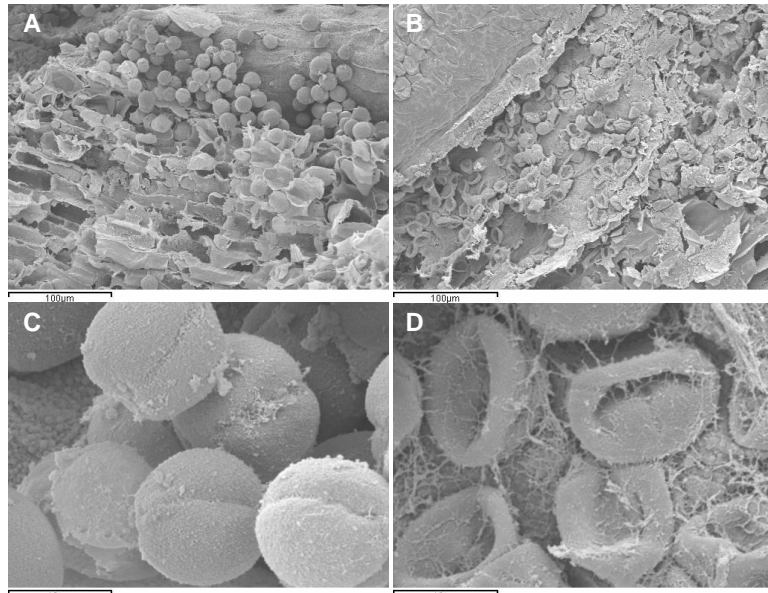


Figura 27. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido de los sacos polínicos y de los granos de polen pertenecientes a anteras silvestres y *PsEND1::barnasa* (genotipo MT TR 9L) del cv. Micro-Tom. (A) Sacos polínicos pertenecientes a una antera silvestre. (B) Sacos polínicos pertenecientes a una antera transgénica *PsEND1::barnasa*. (C) Granos de polen pertenecientes a una antera silvestre. (D) Granos de polen de una antera *PsEND1::barnasa*.

Para comprobar si los granos de polen que aparecían en los sacos polínicos de las plantas transgénicas con fenotipo medio de malformación de las anteras eran viables se analizó la funcionalidad de los mismos. Para ello, los granos de polen se sometieron a una tinción con acetato de carmín para observar su viabilidad. En la Figura 28 se puede apreciar que la viabilidad de los granos de polen existentes en las flores de plantas transgénicas es baja (en torno al 6%). A pesar de constatar la presencia de algunos granos de polen viables en las anteras de estas plantas *PsEND1::barnasa*, nunca se observó en ninguno de los frutos transgénicos la presencia de una sola semilla. La disminución de la cantidad y viabilidad de los granos de polen en estas líneas, así como las alteraciones morfológicas de las anteras, son, probablemente, los factores responsables de la ausencia de semillas en los frutos de estas plantas.

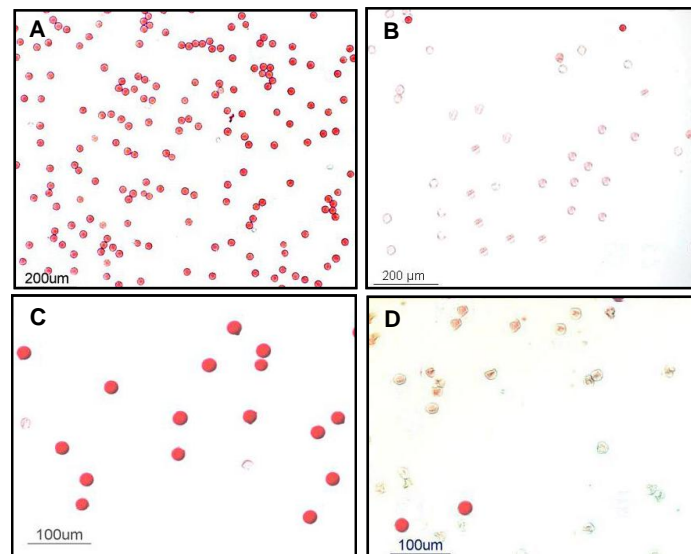


Figura 28. Tinción vital con acetato de carmín del polen de plantas de MT TR 9L (cv. Micro-Tom). (A y C) Granos de polen de una antera de una planta silvestre. (B y D) Granos de polen del genotipo MT TR 9L *PsEND1::barnasa* (fenotipo medio de malformación de las anteras).

3.3. Fructificación de las plantas *PsEND1::barnasa*

3.3.1. Estudio histológico del desarrollo del ovario

El ovario de tomate desarrollado está constituido, básicamente, por el pericarpio, el tejido placentario y los óvulos. El pericarpio está compuesto por una pared externa, las paredes radiales o septos (que separan los lóculos) y la pared interna o columnela. El pericarpio se origina de la pared del ovario y consta de un exocarpo o piel, un mesocarpo parenquimático con haces vasculares y el endocarpo, constituido por una pared unicelular que rodea los lóculos y colinda con la placenta (Chamarro, 1995) (Figura29).

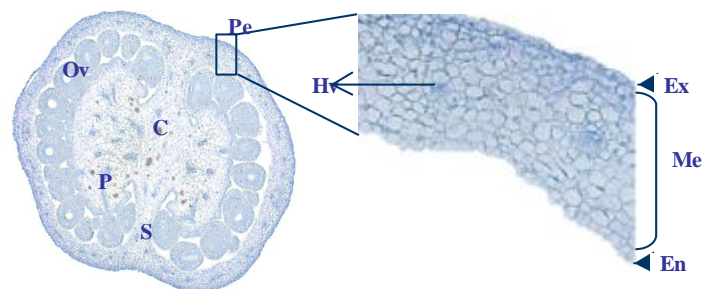


Figura 29. Sección transversal de un ovario de tomate. C: columnela; Ov: óvulos; P: placenta; S: septo; Pe: pericarpio; Hv: haces vasculares; Ex: exocarpo; Me: mesocarpo; En: endocarpo. Adaptado de Gillaspay *et al.*, 1993.

Para caracterizar a nivel histológico el desarrollo del ovario transgénico *PsEND1::barnasa* se realizaron cortes transversales de ovarios de flores silvestres y transgénicas, incluidas en parafina, en los 4 estadios de desarrollo del ovario previos a la antesis. En estos estadios de desarrollo se ha analizado el grosor del pericarpo y de la placenta en los ovarios silvestres y *PsEND1::barnasa* mediante el recuento de capas celulares así como el número y tamaño de las células que las componen. El análisis de estos parámetros se ha llevado a cabo en regiones equivalentes de los ovarios utilizando el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

En la Figura 30 se muestra la comparación entre ovarios silvestres de tomate (cv. Moneymaker) y ovarios transgénicos *PsEND1::barnasa* en cuatro estadios representativos del desarrollo del ovario.

Estadio 1 (5-7 días antes de antesis)

En este estadio se observa que los ovarios transgénicos presentan un mayor tamaño que los ovarios silvestres (Figura 30 A, B y C). El tamaño de los ovarios está determinado por la anchura y la altura de los mismos. En la Figura 30 se representa la anchura y la altura de los ovarios con líneas blancas y azules, respectivamente, de la misma longitud para cada estadio.

El mayor tamaño de los ovarios transgénicos parece deberse al mayor número de células que conforman la columnela y la placenta, ya que el tamaño de las mismas es similar. En otros tejidos evaluados, como el exocarpo y el mesocarpo, no hemos encontrado diferencias en lo que respecta al número de capas celulares y al tamaño y morfología de las células. Los haces vasculares que se extienden paralelamente al exocarpo separando éste del endocarpo también fueron similares en unos ovarios y otros. Los óvulos de los ovarios transgénicos presentaron un tamaño similar al de los óvulos de los ovarios silvestres.

Estadio 2 (3-4 días antes de antesis)

En la Figura 30 (D, E y F) observamos que los ovarios transgénicos siguen presentando mayor tamaño que los ovarios silvestres. Análogamente a lo que ocurría en el estadio 1, el mayor tamaño de los ovarios *PsEND1::barnasa* se debe al mayor número de células que constituyen la columnela y la placenta. En este estadio de desarrollo las diferencias en la anchura de la columnela y placenta de los ovarios transgénicos respecto a los silvestres son menores que las observadas en el estadio 1.

El exocarpo y el mesocarpo presentan el mismo número de capas, constituidas por células de tamaño y morfología similar.

Estadio 3 y 4

En el estadio 3 (1-2 días antes de antesis) (Figura 30 G, H, I) y en el estadio 4 (antesis) (Figura 30 J, K y L) no se observan diferencias de tamaño entre los ovarios transgénicos y los ovarios silvestres. El análisis de los ovarios en regiones equivalentes reveló que no existían diferencias en el número de capas celulares y ni en el tamaño de las células que componen el pericarpo y la placenta.

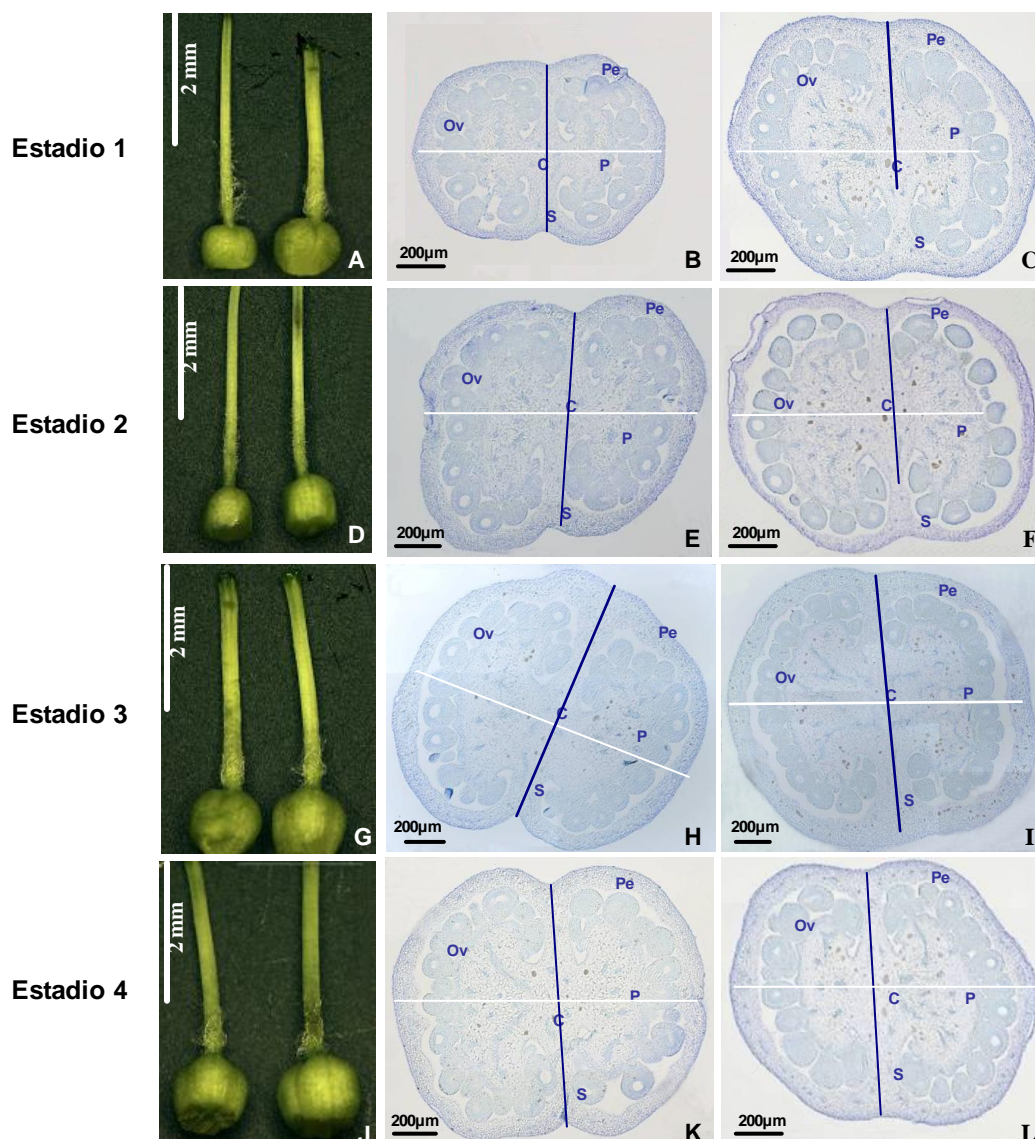


Figura 30. Comparación entre ovarios silvestres (izquierda) y ovarios transgénicos (derecha) del cv. Moneymaker en los estadios de desarrollo 1(A), 2(D), 3(G) y 4(J). Cortes histológicos de los ovarios silvestres (B, E, H, K) y ovarios transgénicos (C, F, I, L). Las líneas blancas y azules que definen la anchura y la altura del ovario son de la misma longitud para cada estadio.

Resumiendo, los resultados del estudio realizado mostraron que las diferencias histológicas observadas entre los ovarios silvestres y *PsEND1::barnasa* se deben al número de células que conforman la columnela y la placenta de los ovarios transgénicos y que, además, estas diferencias son mayores en estadios de desarrollo muy tempranos y van disminuyendo en los estadios posteriores.

3.3.2. Papel de las giberelinas en el desarrollo del ovario transgénico *PsEND1::barnasa*

Las giberelinas son hormonas necesarias para la fructificación y el desarrollo del fruto y están implicadas en la partenocarpia natural del tomate (George *et al.*, 1984);. La aplicación exógena de giberelinas a un ovario de tomate no polinizado imita el efecto de la polinización provocando generalmente el desarrollo partenocárpico del fruto. Se ha corroborado esta relación con diversos experimentos (Mapelli *et al.*, 1979; Sawhney y Greyson, 1973; Fos *et al.*, 2000; Jacobsen y Olszewski, 1993). Además, el tratamiento con paclobutrazol (PCB), un inhibidor de la biosíntesis de las mismas, impide el desarrollo del ovario polinizado, efecto que es revertido por la aplicación exógena de ácido giberélico, GA₃ (Fos *et al.*, 2000).

Para determinar si en la partenocarpia inducida por androesterilidad de nuestras plantas transgénicas están implicadas, o no, las giberelinas hemos llevado a cabo diversos tratamientos con ácido giberélico (GA₃) y paclobutrazol (PCB) en las plantas del cv. Micro-Tom silvestres y transgénicas *PsEND1::barnasa*.

Los ovarios de plantas silvestres que se polinizan de forma natural son capaces de desarrollar frutos con semillas (Figura 31 A, B, C); los ovarios de plantas silvestres que se emascularon dos días antes de anthesis y no fueron tratados exógenamente con GA₃ detuvieron su crecimiento y no se desarrollaron. La aplicación de GA₃ a ovarios silvestres emasculados estimuló el desarrollo del ovario y la producción de frutos partenocárpicos (Figura 31 D, E, F). Estos frutos partenocárpicos presentaban lóculos vacíos, en los que se podían observar, en ocasiones, óvulos abortados y, algunos de estos frutos aparecían malformados.

La aplicación de PCB mediante el agua de riego a las plantas silvestres del cv. Micro-Tom conllevó la detención del desarrollo de los ovarios de las mismas, observándose un ovario similar un ovario silvestre emasculado (Figura 31 G, H, I).

Por su parte los ovarios de las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* se desarrollan partenocárpicamente de manera natural hasta dar lugar a frutos bien formados (Figura 32 A, B, C). Cuando se aplicó PCB a las plantas *PsEND1::barnasa* se inhibió el

desarrollo de los ovarios (Figura 32 D, E, F). Este efecto causado por la aplicación de PCB fue revertido completamente por la posterior aplicación de GA₃, de manera que los ovarios comenzaron a desarrollarse hasta dar lugar a frutos sin semillas (Figura 32 G, H, I).

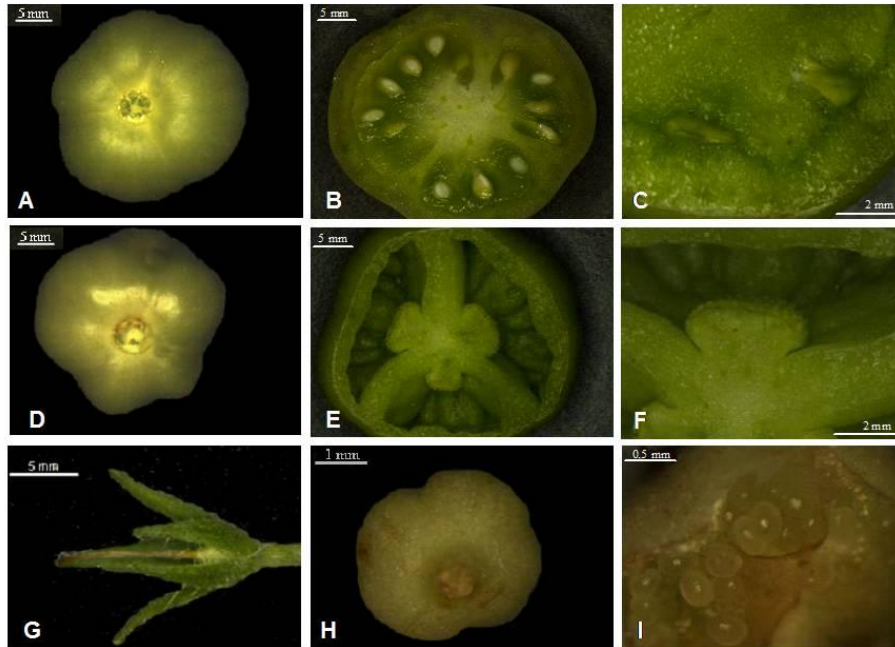


Figura 31. Efecto de las giberelinas en el desarrollo del ovario silvestre del cv. Micro-Tom de tomate recogidos 20 días después de la antesis. (A, B, C) Ovarios polinizados de forma natural. (D, E, F) Ovarios emasculados dos días antes de la antesis y tratados con GA₃ el día de la antesis. (G, H, I) Ovarios procedentes de flores emasculadas manualmente dos días antes de la antesis.



Figura 32. Efecto de las giberelinas en el desarrollo de los ovarios transgénicos *PsEND1::barnasa* del cv. Micro-Tom de tomate recogidos 20 días después de la antesis. (A, B, C) Ovarios desarrollados de forma natural. (D, E) Ovarios procedentes de plantas regadas con una solución de PCB. (G, H, I) Ovarios procedentes de plantas regadas previamente con PCB y tratadas posteriormente con GA₃. (F) Comparación entre un ovario tratado con PCB (derecha) y otro ovario, que después de ser tratado con PCB se trató con GA₃ (izquierda).

Estos resultados sugirieron que el desarrollo del ovario y el crecimiento del fruto es un fenómeno dependiente de síntesis de giberelinas, puesto que, cuando se aplica a los ovarios transgénicos un inhibidor de la síntesis de GAs, éstos fueron incapaces de desarrollarse; en cambio, si posteriormente se les aplica GA_3 el efecto se revierte y los ovarios comienzan a desarrollarse de nuevo.

4. Evaluación de las características físicas de calidad de los frutos de plantas transgénicas (TG1) *PsEND1::barnasa*

Todas las plantas de tomate *PsEND1::barnasa* de los diferentes cultivares estudiados produjeron frutos partenocárpicos y, por tanto, carentes de semillas (Figura 33). Cuando las flores de las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* fueron polinizadas con polen de anteras de plantas silvestres, se obtuvieron frutos que alcanzaban un tamaño normal y que tenían semillas similares, en número y morfología, a las producidas por los frutos de las plantas silvestres.

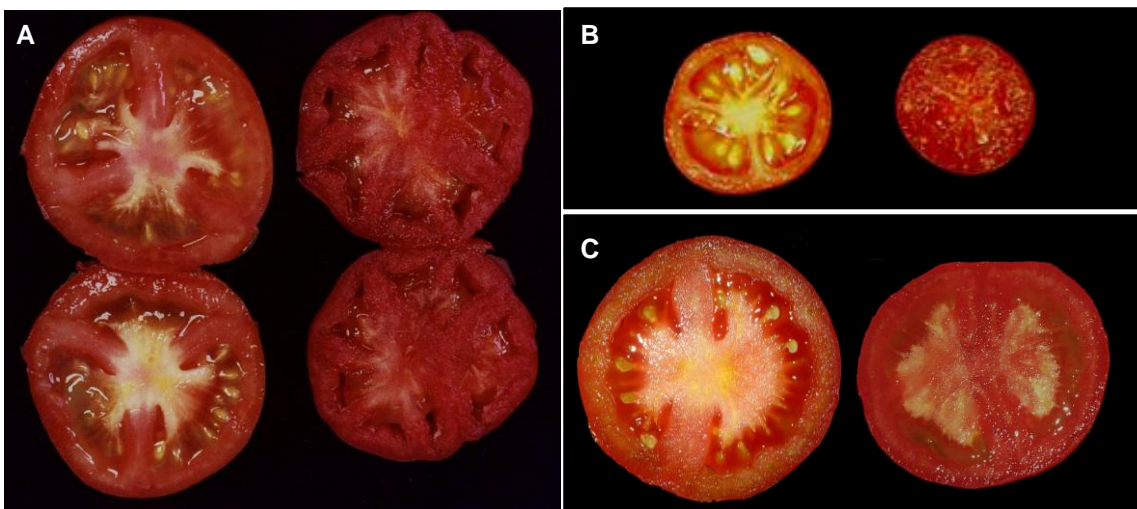


Figura 33. Frutos de tomate de los tres cultivares estudiados. (A) Fruto silvestre (izquierda) y *PsEND1::barnasa* (derecha) del cv. p73. (B) Fruto silvestre (izquierda) y *PsEND1::barnasa* (derecha) del cv. Micro-Tom. (C) Fruto silvestre (izquierda) y *PsEND1::barnasa* (derecha) del cv. Moneymaker.

Se realizó una evaluación de diferentes aspectos relacionados con la calidad de los frutos de tomate de los cultivares Micro-Tom, p73 y Moneymaker. Los atributos físicos evaluados fueron: peso, diámetro o anchura, altura, ratio entre anchura/altura, altura de los hombros, diámetro de la cicatriz peduncular, espesor de la piel, espesor del

pericarpo y número de lóculos de los frutos (Figura 34). Como atributos del fruto procesado se evaluaron: contenido en sólidos solubles, acidez titulable, índice de sabor y el color. En los ocho genotipos transgénicos del cv. Moneymaker que presentaron las características de calidad de fruto más interesantes, se evaluó el perfil de compuestos volátiles. Por último, tras la evaluación de los compuestos volátiles se seleccionaron dos genotipos transgénicos del cv. Moneymaker, por ser los que mostraron mayores diferencias respecto a los silvestres, y se evaluó en ellos el contenido en metabolitos primarios. La elección de estos parámetros derivó de la búsqueda bibliográfica de los atributos de calidad más valorados en el mercado para el consumo en fresco de este fruto.

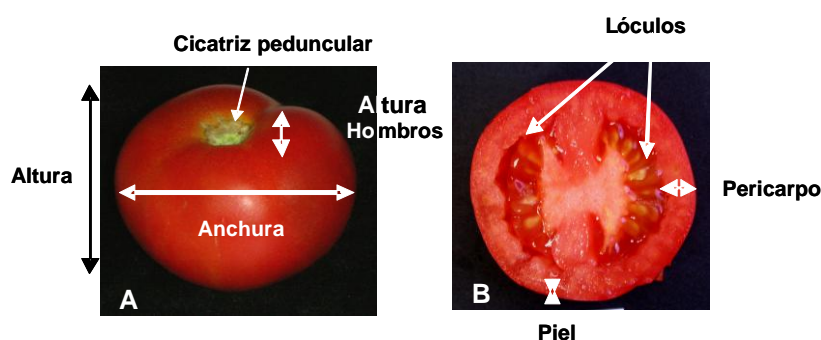


Figura 34. Atributos físicos evaluados en el fruto de tomate. (A) Fruto entero indicando algunas dimensiones utilizadas para la caracterización física. (B) Sección transversal del fruto donde se muestran parámetros y regiones utilizadas en nuestro análisis.

4.1. Peso medio de los frutos, número total de frutos por planta y peso total frutos por planta

Para ninguno de estos caracteres se han observado diferencias significativas entre los testigos internos y sus correspondientes genotipos silvestres.

cv. Micro-Tom

En general, el peso medio de los frutos fue significativamente menor en los genotipos transgénicos que en el silvestre. Sólo el genotipo transgénico MT TR 1d presentó frutos con un peso medio similar a los del genotipo silvestre. Respecto al número total de frutos producidos por planta, todos los genotipos transgénicos evaluados produjeron mayor número de frutos (entre 10 y 27 frutos más que el silvestre), dependiendo del genotipo.

En lo que respecta al peso total de frutos por planta, los genotipos transgénicos analizados no presentaron diferencias significativas respecto al silvestre mostrando un peso total de frutos producidos por planta similar al de los silvestres (Tabla 14). La excepción fue el genotipo transgénico MT TR 1d, que produjo más kilos por planta que el silvestre.

En general podemos decir que la producción obtenida en los genotipos transgénicos es igual a la de las plantas silvestres. Esto podría explicarse porque, aunque los primeros presentan frutos con menor peso, producen mayor número de frutos por planta. En los genotipos silvestres el número de frutos producidos por planta es menor pero éstos pesan más.

Tabla 14. Peso medio total de frutos por planta, nº de frutos medio por planta y peso medio de los frutos para el genotipo silvestre y los genotipos *PsEND1::barnasa* del cv. Micro-Tom estudiados. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Valores medios y errores estándar.

GENOTIPO	PESO MEDIO FRUTO (g)	Nº TOTAL FRUTOS/PLANTA	PESO TOTAL FRUTOS/PLANTA (g)
MT	4,78 ± 0,15	64 ± 3,06	305,92 ± 6,23
MT TR 15e	3,94 ± 0,53 a	80,00 ± 3,43 a	315,20 ± 4,23
MT TR 1f	3,91 ± 0,19 a	75,70 ± 6,23 a	295,99 ± 5,13
MT TR 1d	4,98 ± 0,28	73,53 ± 3,04 a	366,18 ± 4,61 a
MT TR 9L	3,25 ± 0,11 a	91,00 ± 2,22 a	295,75 ± 4,20

cv. p73

Como se puede observar en la Tabla 15, el peso medio de los frutos de las plantas silvestres (89,89 g) fue superior al de los frutos de los genotipos transgénicos p73 TR1, p73 TR2, p73 TR4 y p73 TR7, cuyos pesos medios aproximados fueron de 40,00, 36,84, 33,79 y 36,64 g, respectivamente. El peso de los frutos producidos por los genotipos transgénicos es más homogéneo que el de los frutos del genotipo silvestre. El número total de frutos por planta obtenido en los genotipos transgénicos se incrementó entre un 47,52% y un 142% (dependiendo del genotipo) con respecto al silvestre. Así pues, mientras que el genotipo silvestre produjo en promedio 18,98 frutos por planta, los genotipos transgénicos produjeron, según genotipo, entre 28 y 46 frutos/planta (Tabla 15).

La evaluación del peso total de frutos cosechados por planta reveló que, en general los genotipos transgénicos redujeron su producción entre un 18% y un 40% respecto a

los genotipos silvestres. Como excepción cabe destacar el genotipo transgénico p73 TR1, que presentó un peso total de frutos cosechados (1840,46 g) mayor que el observado en las plantas del genotipo silvestre (1706,11 g).

Tabla 15. Peso medio total de frutos por planta, nº de frutos medio por planta y peso medio de los frutos para el genotipo silvestre y los genotipos *PsEND1::barnasa* del cv. p73 estudiados. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Valores promedio y errores estándar.

GENOTIPO	PESO MEDIO FRUTO (g)	Nº TOTAL FRUTOS/PLANTA	PESO TOTAL FRUTOS/PLANTA (g)
p73	89,89 ± 5,88	18,98 ± 1,19	1706,11 ± 49,52
p73 TI	79,26 ± 5,67	22,30 ± 5,30	1767,50 ± 67,32
p73 TR1	40,01 ± 5,78 a	46,00 ± 2,83 a	1840,46 ± 14,28 a
p73 TR2	36,84 ± 2,83 a	38,00 ± 4,24 a	1399,92 ± 40,24 a
p73 TR4	33,79 ± 5,30 a	30,50 ± 1,41 a	1030,60 ± 16,12 a
p73 TR7	36,64 ± 2,83 a	28,00 ± 2,83 a	1025,92 ± 16,10 a

cv. Moneymaker

Como se puede observar en la Tabla 16 al evaluar el peso medio de los frutos podemos dividir a los genotipos transgénicos en dos grupos: un primer grupo (MMK TR 38.1, MMK TR 40.1, MMK TR 59.1, MMK TR 39.1, MMK TR 48.2 y MMK TR 48.1) constituido por genotipos que presentaron frutos con un peso medio significativamente menor que los de las plantas silvestres y otro grupo formado por MMK TR 44.2, MMK TR 44.1, MMK TR 67.1 y MMK TR 26.1 que presentaron frutos cuyo peso medio fue similar al de los frutos de las plantas silvestres. Todos los genotipos transgénicos produjeron frutos con un peso más homogéneo que los frutos del genotipo silvestre.

Respecto al número total de frutos producidos por planta, en 6 de los 10 genotipos transgénicos, el número total de frutos producidos por planta se incrementó entre un 35,27 % y un 90,92% respecto al número de frutos producidos por las plantas silvestres (con un total de 29,20 frutos por planta). Estos genotipos, en general, también habían presentado igual o mayor número de inflorescencias por planta y, todos ellos presentaron mayor número de flores por inflorescencia; esta podría ser la razón por la que han producido mayor número de frutos por planta. El resto de genotipos transgénicos (MMK TR 44.2, MMK TR 44.1, MMK TR 67.1 y MMK TR 26.1) produjeron un número de frutos por planta similar al de los genotipos silvestres (entre 29,64 y 31 frutos por planta). Estos genotipos también habían presentado un número

similar de inflorescencias por planta y flores por inflorescencia que el genotipo silvestre.

En cuanto al peso total de los frutos cosechados por planta, no se apreciaron diferencias significativas entre el genotipo silvestre y 70% de los genotipos transgénicos. Los genotipos transgénicos que mostraron diferencias significativas respecto al genotipo silvestre fueron: MMK TR 38.1, MMK TR 40.1, y MMK TR 44.2, que presentaron una reducción del peso total de frutos cosechados por planta de un 17,82%, 19,08% y 5%, respectivamente.

En conclusión podríamos decir que, en general, los genotipos transgénicos mostraron un rendimiento (kilos cosechados por planta) similar al del genotipo silvestre; las diferencias existentes entre ellos residen en el peso de los frutos (inferior en los genotipos transgénicos) y en el número de frutos por planta (mayor en los genotipos transgénicos).

Tabla 16. Peso medio total de frutos por planta, nº de frutos medio por planta y peso medio de los frutos para el genotipo silvestre y los genotipos *PsEND1::barnasa* del cv. Moneymaker estudiados. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Valores medios y errores estándar.

GENOTIPO	PESO MEDIO FRUTO (g)	Nº TOTAL FRUTOS/PLANTA	PESO TOTAL FRUTOS/PLANTA (g)
MMK	63,63 ± 15,61	29,20 ± 1,46	1857,99 ± 39,58
MMK TI 4.2	73,84 ± 20,34	26,03 ± 2,53	1922,05 ± 41,26
MMK TI 1.1	65,28 ± 23,30	28,00 ± 1,17	1827,84 ± 60,33
MMK TI 6.1	63,39 ± 25,38	28,50 ± 1,10	1806,61 ± 25,88
MMK TR 38.1	27,39 ± 4,63 a	55,75 ± 2,10 a	1526,99 ± 24,75 a
MMK TR 40.1	29,19 ± 6,58 a	51,51 ± 2,18 a	1503,57 ± 29,10 a
MMK TR 59.1	38,69 ± 4,73 a	48,27 ± 3,19 a	1867,56 ± 13,17
MMK TR 39.1	43,39 ± 4,40 a	42,59 ± 2,34 a	1847,98 ± 27,60
MMK TR 48.2	44,11 ± 3,60 a	41,62 ± 2,87 a	1835,85 ± 24,40
MMK TR 48.1	45,09 ± 2,69 a	39,50 ± 1,28 a	1781,05 ± 37,50
MMK TR 44.2	56,94 ± 13,63	31,00 ± 1,17	1765,14 ± 14,04 a
MMK TR 44.1	58,78 ± 10,61	31,00 ± 2,17	1822,18 ± 11,41
MMK TR 67.1	63,22 ± 6,60	30,00 ± 2,35	1896,60 ± 27,73
MMK TR 26.1	64,89 ± 4,60	29,64 ± 1,25	1923,34 ± 37,41

4.2. Anchura, altura y ratio anchura/altura de los frutos

En lo que respecta a estos parámetros, no hemos observado diferencias significativas entre los genotipos silvestres y los testigos internos para cada uno de los cultivares estudiados.

cv. Micro-Tom

Respecto a estos parámetros, el genotipo MT TR 1d, que no había mostrado diferencias significativas en el peso de los frutos frente al genotipo silvestre, tampoco presentó diferencias significativas respecto a la altura y anchura de sus frutos. Sin embargo, los otros tres genotipos transgénicos estudiados sí que mostraron diferencias significativas frente a los genotipos silvestres respecto a la anchura del fruto (MT TR 1f y MT TR 9L), la altura del mismo, (MT TR 15e, MT TR 1f, MT TR 9L) o respecto a ambos parámetros (MT TR 1f y MT TR 9L) (Figura 35).

El ratio anchura/altura fruto en los frutos silvestres de Micro-Tom oscila en torno a 1. La mitad de los genotipos estudiados no presentaron diferencias significativas para dicho ratio. Cabe mencionar que el genotipo MT TR 9L mostró frutos ligeramente más altos que anchos (ratio=0,95) y el genotipo MT TR 15e mostró frutos ligeramente más anchos que altos (ratio= 1,19). En general, los frutos de los genotipos transgénicos del cv. Micro-Tom presentaron forma redondeada, al igual que los frutos silvestres de este cultivar.

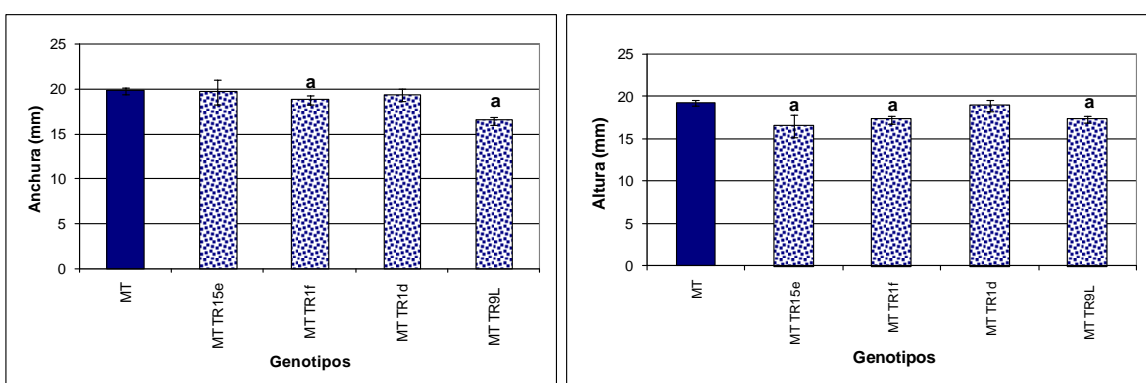


Figura 35. Forma de los frutos de los genotipos transgénicos y del genotipo silvestre del cv. Micro-Tom. (A) Anchura media de los frutos de los genotipos transgénicos y del genotipo silvestre. (B) Altura media de los frutos de los genotipos transgénicos y del genotipo silvestre. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Valores medios y errores estándar.

cv. p73

En lo que respecta a la anchura del fruto, todos los genotipos transgénicos evaluados mostraron una anchura de fruto significativamente menor que la anchura de los frutos silvestres (Figura 36A). La altura media de los frutos se redujo en 2 de los 4 genotipos transgénicos evaluados (p73 TR2 y p73 TR4) entre un 24,89 % y un 30,28% respectivamente respecto al genotipo silvestre (Figura 36B).

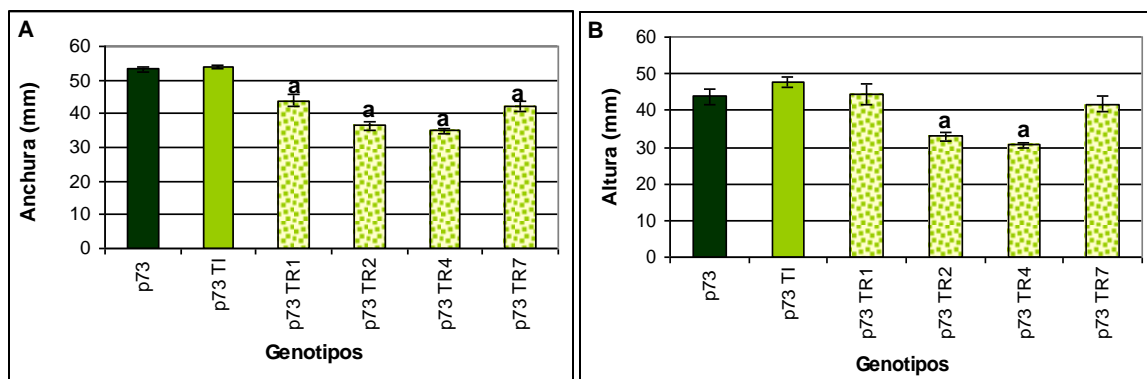


Figura 36. Forma de los frutos transgénicos y silvestres del cv. p73. (A) Anchura media de los frutos de los genotipos transgénicos y del genotipo silvestre. (B) Altura media de los frutos de los genotipos transgénicos y del genotipo silvestre. La letra “a” indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Valores medios y errores estándar.

Los frutos silvestres del cv. p73 son ligeramente más anchos que altos (ratio anchura/altura es igual a 1,2). El ratio para todos los genotipos transgénicos evaluados osciló entre 0,98 y 1,14; esto significa que los frutos de las plantas transgénicas son más redondeados (tienen la misma anchura y altura) que los de los genotipos silvestres.

cv. Moneymaker

Respecto a estos dos parámetros evaluados cabe mencionar que 4 de los genotipos que presentaron frutos con menor peso mostraron también una anchura y altura significativamente inferiores que las mostradas por los frutos de las plantas silvestres. Estos genotipos (MMK TR 38.1, MMK TR 40.1, MMK TR 59.1 y MMK TR 39.1) representan el 40% del total de genotipos transgénicos. Los otros 2 genotipos que presentaron menor peso que el genotipo silvestre (MMK TR 48.1 y MMK TR 48.2) mostraron la misma anchura pero menor altura que los frutos del genotipo silvestre.

Análogamente, los genotipos transgénicos (MMK TR 44.2, MMK TR 44.1, MMK TR 67.1 y MMK TR 26.1), cuyos frutos presentaron un peso similar al de las plantas silvestres mostraron, en general, frutos con dimensiones (anchura y altura) similares a los mismos (Figura 37). Los frutos silvestres del cv. Moneymaker son redondeados, lo que significa que el ratio anchura/altura es igual a 1. Los frutos de los genotipos transgénicos también presentaron un ratio igual a 1, lo que significa que su forma es redondeada.

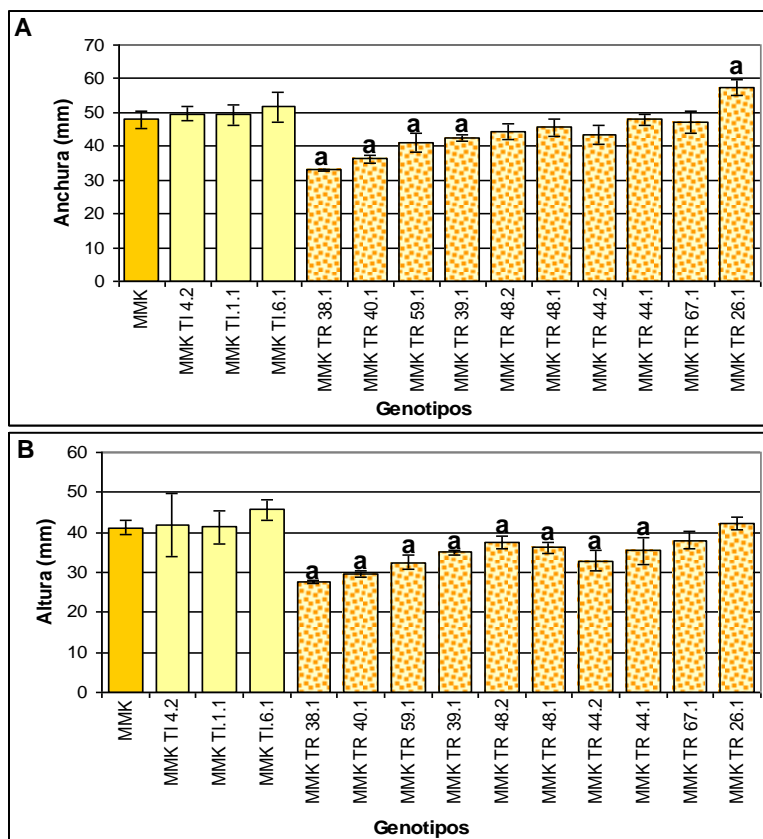


Figura 37. Forma de los frutos transgénicos y silvestres del cv. Moneymaker. (A) Anchura media de los frutos de los genotipos transgénicos y del genotipo silvestre. (B) Altura media de los frutos de los genotipos transgénicos y del genotipo silvestre. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Valores medios y errores estándar.

4.3. Cicatriz peduncular y altura de los hombros de los frutos

Las medidas de la altura de los hombros del fruto y el diámetro de la cicatriz peduncular de los mismos están correlacionadas con la facilidad de pelado de los mismos. Se ha visto que los frutos con gran altura de hombros y con cicatrices pedunculares de gran diámetro presentan mayor dificultad de pelado (García y Barrett, 2006). Los genotipos utilizados como testigos internos de la transformación han presentado cicatrices pedunculares y hombros similares a los frutos de los genotipos silvestres.

cv. Micro-Tom

Para tres de los cuatro genotipos transgénicos estudiados no se observaron diferencias significativas para el carácter diámetro de la cicatriz peduncular del fruto; sólo el genotipo MT TR 9L presentó una cicatriz peduncular menor que la observada en el genotipo silvestre (Figura 38A). En lo que respecta a la altura de los hombros de

los frutos, todos los genotipos transgénicos estudiados presentaron una reducción comprendida entre un 1,80 y un 14,27% al compararlos con frutos de plantas silvestres (Figura 38B).

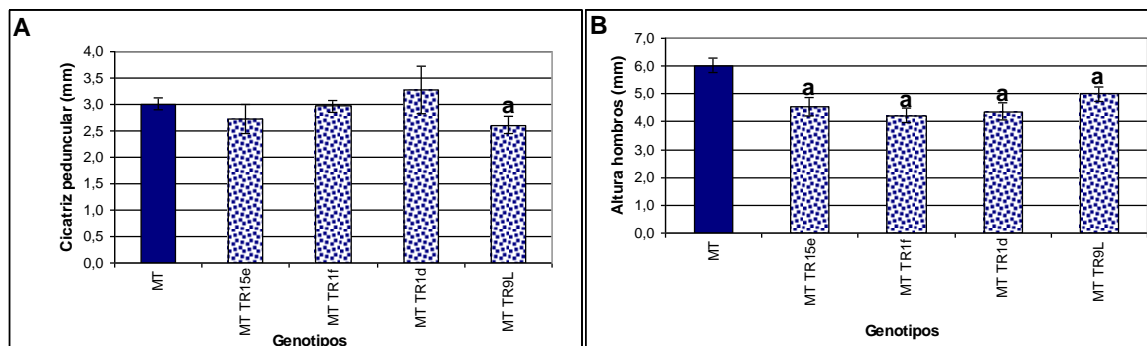


Figura 38. (A) Diámetro de la cicatriz peduncular y (B) Altura de los hombros de los frutos de las plantas transgénicas frente a los de las planta silvestres en el cv. Micro-Tom. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Valores medios y errores estándar.

cv. p73

En los genotipos transgénicos de este cultivar se observó una reducción del diámetro de la cicatriz peduncular de los frutos comprendida entre un 28,07% y un 42,76% respecto a las de los frutos de las plantas silvestres (Figura 39A). Además, la altura de los hombros de los frutos transgénicos también se redujo entre un 11,62% y un 35,71% respecto a la de los frutos silvestres (Figura 39B).

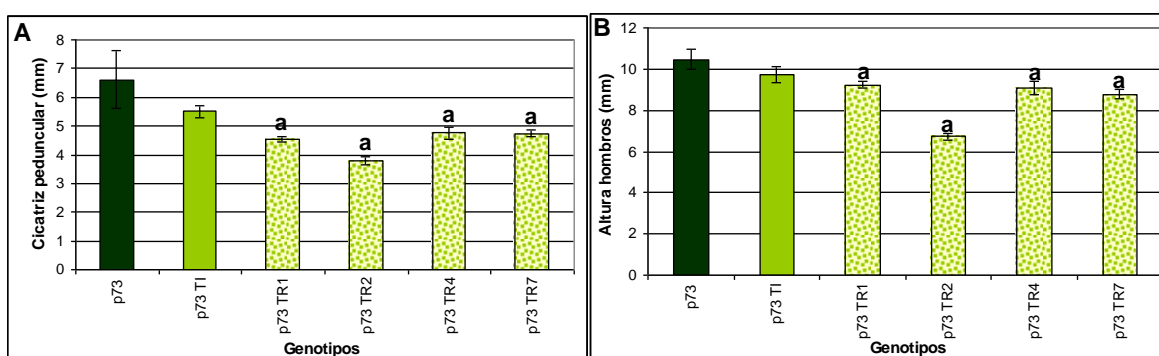


Figura 39. (A) Diámetro de la cicatriz peduncular y (B) Altura de los hombros de los frutos de las plantas transgénicas frente a los de las plantas silvestres en el cv. p73. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Valores medios y errores estándar.

cv. Moneymaker

El 50% de los genotipos transgénicos mostraron valores de cicatrices pedunculares menores que los de los genotipos silvestres; el 50% restante presentaron cicatrices pedunculares iguales que los de los frutos silvestres (Figura 40A). Respecto a la altura de hombros, el 100% de los genotipos transgénicos mostraron frutos con hombros más pequeños que los exhibidos por los silvestres (Figura 40B)

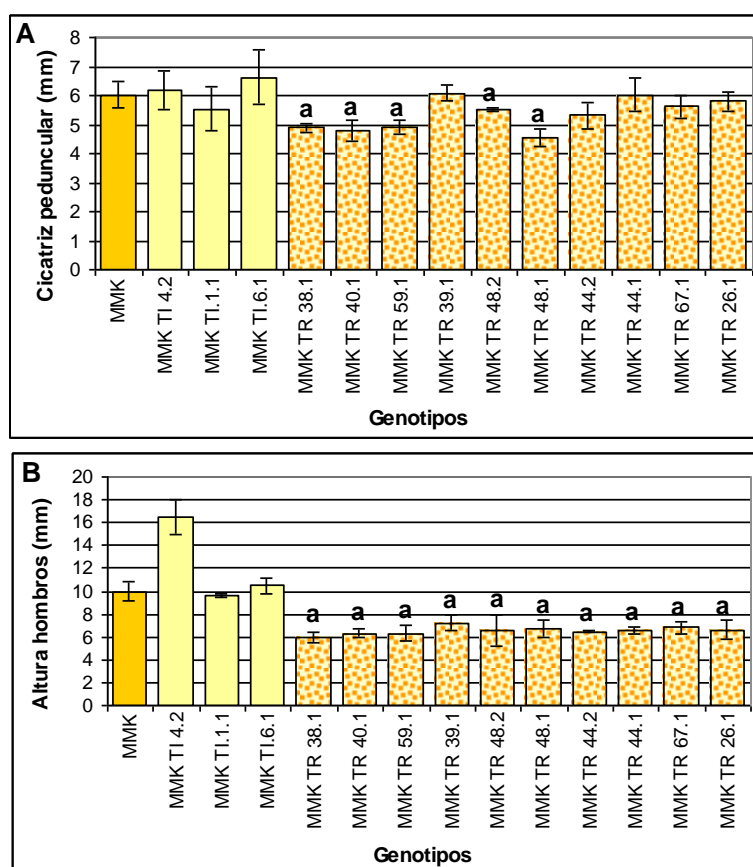


Figura 40. (A) Diámetro de la cicatriz peduncular y (B) Altura de los hombros de los frutos de las plantas transgénicas frente a los de las plantas silvestres en el cv. Moneymaker. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Valores medios y errores estándar.

En general, los frutos de las plantas transgénicas de los tres cultivares presentaron cicatrices pedunculares y hombros más pequeños que los frutos de las plantas silvestres; este hecho, según García y Barrett, 2006, podría estar correlacionado con una mayor facilidad de pelado de los frutos transgénicos respecto a los silvestres.

4.4. Espesor del pericarpio y de la piel y de los frutos

Las diferencias genotípicas del pericarpio y la piel están asociadas a características de importancia económica. Diferentes estudios sobre frutos de tomate han revelado que existen diferencias morfológicas entre cultivares que se podrían correlacionar con la mayor o menor susceptibilidad al agrietado del mismo (Cotner *et al.*, 1969; Chu y Thompson, 1972). Los cultivares más resistentes al agrietado mostrarían un grosor de la piel y el pericarpio mayor al de los cultivares susceptibles.

En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas para estos dos parámetros en ninguno de los genotipos transgénicos individuales para ninguno de los cultivares estudiados.

4.5. Número de lóculos de los frutos

En los cultivares silvestres de tomate el fruto generalmente es bilocular, mientras que en las variedades cultivadas puede oscilar entre bilocular y 30-locular, siendo lo más frecuente, de 5 a 9 lóculos. Los testigos internos de la transformación han mostrado frutos con un número de lóculos similar al de los frutos del genotipo silvestre.

cv. Micro-Tom

El genotipo silvestre de este cultivar presentó frutos que, en promedio, tenían 2,33 lóculos. Tres de los cuatro genotipos transgénicos evaluados no mostraron diferencias significativas respecto al silvestre para este carácter. Cabe mencionar el caso del genotipo MT TR 15e, que presentó todo su interior ocupado por la placenta (frutos “todo carne”), no pudiendo distinguir en él un número determinado de lóculos.

Tabla 17. N° medio de lóculos medio \pm errores estándar de los frutos de plantas transgénicas y silvestres del cv. Micro-Tom

GENOTIPO	Nº LÓCULOS
MT	2,33 \pm 0,17
MT TR 15e	0,00 \pm 0,00 a
MT TR 1f	2,33 \pm 0,25
MT TR 1d	2,30 \pm 0,23
MT TR 9L	2,34 \pm 0,16

cv. p73

El genotipo silvestre de este cultivar presentó frutos con un número medio de lóculos comprendido entre 4 y 5. Los genotipos transgénicos mostraron entre 4,11 y 4,45 lóculos por fruto; por tanto, para este cultivar tampoco se observaron diferencias significativas entre los genotipos transgénicos estudiados y los silvestres.

Tabla 18. N° medio de lóculos \pm errores estándar de los frutos de plantas transgénicas y silvestres del cv. p73

GENOTIPO	N° LOCULOS
p73	4,25 \pm 0,09
p73 TI	4,33 \pm 0,09
p73 TR 1	4,45 \pm 0,12
p73 TR2	4,27 \pm 0,30
p73 TR 4	4,13 \pm 0,20
p73 TR 7	4,11 \pm 0,10

cv. Moneymaker

Los frutos de las plantas silvestres presentan, en promedio 2,30 lóculos por fruto. El 80% de los genotipos transgénicos no mostraron diferencias significativas respecto al número de lóculos comparándolos con los frutos de las plantas silvestres. El 20% restante (MMK TR 38.1 y MMK TR 40.1) presentaron frutos con menor número de lóculos que los silvestres; estos genotipos también presentaron frutos con menor peso, menor anchura y menor altura. En general, podríamos decir que los frutos de las plantas transgénicas presentaron el mismo número de lóculos que los frutos de las plantas silvestres.

Tabla 19. N° medio de lóculos medio \pm errores estándar de los frutos de plantas transgénicas y silvestres del cv. Moneymaker.

GENOTIPO	N° LÓCULOS
MMK	2,30 \pm 0,16
MMK TI 4.2	2,33 \pm 1,01
MMK TI 1.1	2,38 \pm 1,03
MMK TI 6.1	2,42 \pm 0,09
MMK TR 38.1	2,00 \pm 0,01 a
MMK TR 40.1	2,10 \pm 0,03 a
MMK TR 59.1	2,33 \pm 0,18
MMK TR 39.1	2,40 \pm 0,17
MMK TR 48.2	2,42 \pm 0,17
MMK TR 48.1	2,54 \pm 0,15
MMK TR 44.2	2,20 \pm 0,20
MMK TR 44.1	2,40 \pm 0,20
MMK TR 67.1	2,46 \pm 0,21
MMK TR 26.1	2,63 \pm 0,20

5. Evaluación de las características de calidad del fruto procesado de los frutos de plantas transgénicas (TG1) *PsEND1::barnasa*

Los genotipos silvestres y sus correspondientes testigos internos no mostraron diferencias significativas para ninguna de las características de calidad del fruto procesado evaluadas.

5.1. Contenido en sólidos solubles (°Brix)

La determinación del contenido en sólidos solubles presentes en el zumo de tomate se realizó mediante técnicas refractométricas (MAPA, 1993). La unidad de dichas medidas son los °Brix, equivalentes al porcentaje en sólidos solubles. En general los °Brix de los cultivares comerciales de tomate oscilan entre 4,0 y 6,0; valores superiores (en torno a 8,0-11,0 °Brix) sólo se alcanzan en frutos de cultivares tipo cherry y en frutos de especies silvestres de *Solanum*, sin valor comercial (Poysa, 1993). El análisis de sólidos solubles puede utilizarse como un estimador del contenido total de azúcares presentes en una muestra.

cv. Micro-Tom

Todos los genotipos transgénicos evaluados mostraron un contenido en sólidos solubles mayor que el mostrado por los genotipos silvestres (Figura 41A). Mientras que los frutos del genotipo silvestre (MT) presentaron un contenido de sólidos solubles de 5,45 °Brix, los frutos de los genotipos transgénicos presentaron valores comprendidos entre 7,18 (MT TR 1d) y 8,53 (MT TR 15e), lo que representa un incremento de sólidos solubles comprendido entre un 31,74% y un 56,51%.

cv. p73

El genotipo silvestre de este cultivar (p73) presentó un contenido en sólidos solubles de 4,55 °Brix. El 100% de los genotipos transgénicos evaluados presentaron un incremento en el contenido de sólidos solubles comprendido entre el 14,95% y el 47,69% (Figura 41B).

cv. Moneymaker

El genotipo silvestre del cv. Moneymaker (MMK) presentó un contenido en sólidos solubles de 4,14 °Brix. En nuestro estudio el 90% de los genotipos transgénicos

presentaron mayor contenido en sólidos solubles; este incremento del contenido en sólidos solubles varió entre un 13,53% (MMK TR 59.1) y un 53,62% (MMK TR 48.1)(Figura 41C).

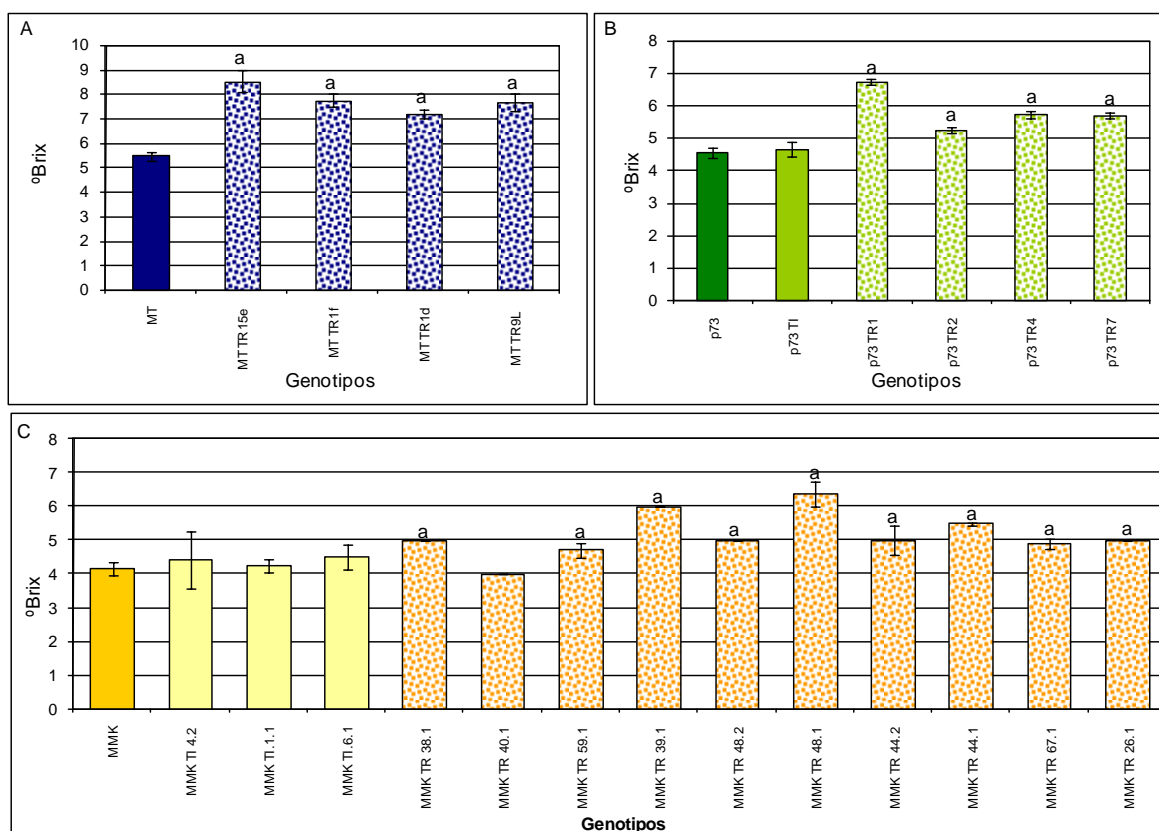


Figura 41. Contenido en sólidos solubles (°Brix) de los frutos de los genotipos de tomate evaluados pertenecientes a diversos cultivares. (A) cv. Micro-Tom, (B) cv. p73 y (C) cv. Moneymaker. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos transgénicos evaluados respecto a sus correspondientes genotipos silvestres. Valores medios y errores estándar.

5.2. Acidez titulable

La determinación de la acidez titulable se realizó mediante valoración ácido-básica. Los resultados se expresan como porcentaje de ácido cítrico, por ser éste el ácido titulable mayoritario en la muestra.

cv. Micro-Tom

El 50% de los genotipos transgénicos evaluados presentaron menor acidez que el genotipo silvestre. Así pues, mientras que el genotipo silvestre (MT) presentó una acidez titulable del 0,60%, los genotipos transgénicos MT TR 15e y MT TR 1f presentaron valores de acidez del 0,54% y 0,57%, respectivamente. Por otra parte, los genotipos MT TR 1d y MT TR 9L no mostraron diferencias significativas respecto al silvestre para este carácter (Figura 42A).

cv. p73

El 100% de los genotipos transgénicos analizados presentaron menor acidez que el genotipo silvestre (p73) (Figura 42B). Los genotipos transgénicos mostraron una acidez comprendida entre 0,43% y 0,50% frente al 0,54% que mostraron los frutos de plantas silvestres.

cv. Moneymaker

El 80% de los genotipos transgénicos presentaron menor acidez titulable que los frutos del genotipo silvestre (MMK); de esta manera, mientras que estos genotipos transgénicos presentaron una acidez comprendida entre 0,20% y 0,47% (dependiendo del genotipo), los frutos de las plantas silvestres mostraron una acidez de 0,50% (Figura 42C). Los genotipos MMK TR 48.1 y MMK TR 44.2 no presentaron diferencias significativas para la acidez respecto al genotipo silvestre. En ocasiones, el hecho de presentar menor acidez no está correlacionado con presentar un valor elevado de sólidos solubles; así pues, el genotipo MMK TR 48.1, que presentó una elevada acidez, también mostró un elevado valor de contenido en sólidos solubles; por tanto, es importante calcular y conocer el índice de sabor de los tomates de los genotipos estudiados.

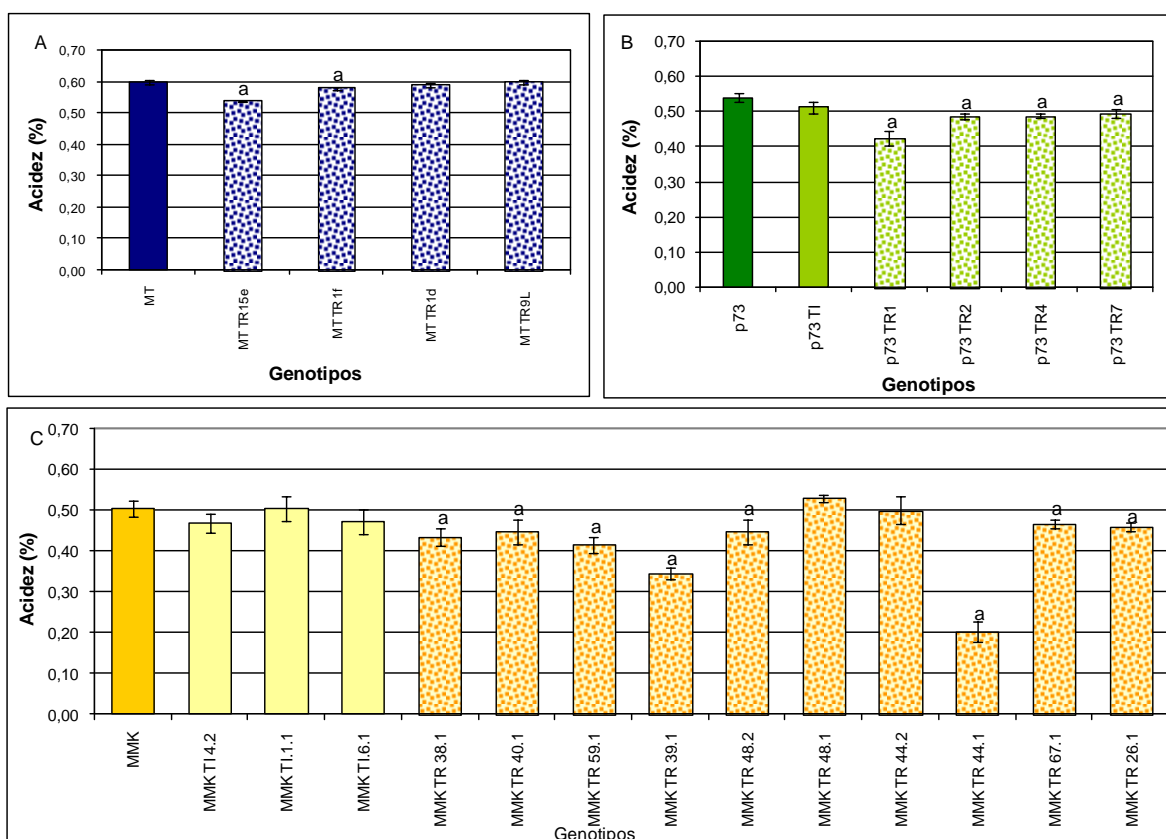


Figura 42. Acidez titulable media (% de ácido cítrico) ± errores estándar correspondientes a frutos transgénicos de los tres cultivares estudiados. (A) cv. Micro-Tom, (B) cv. p73 y (C) cv. Moneymaker. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre.

5.3. Índice de sabor

El índice de sabor del fruto se puede estimar mediante la relación °Brix/acidez titulable. Scott y Walls, 1947 observaron que valores elevados de la relación °Brix/acidez titulable se correlaciona con un sabor suave del fruto, indicando una excelente combinación azúcar-ácido, mientras que valores bajos de dicha relación se correlacionan con un sabor ácido del mismo.

cv. Micro-Tom

El índice de sabor del genotipo silvestre fue 9,08 mientras que el índice de sabor de los frutos pertenecientes a los genotipos transgénicos evaluados osciló entre 12,17 y 15,80. Esto indicaría que los frutos transgénicos tendrían un sabor más suave que los frutos silvestres (Tabla 20).

Tabla 20. Contenido en sólidos solubles (°Brix), acidez titulable (%) e índice de sabor de frutos de tomate de diferentes genotipos transgénicos y del genotipo silvestre del cultivar Micro-Tom (MT). La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos transgénicos evaluados respecto al silvestre. Los valores de todos los parámetros evaluados se expresan como la media \pm error estándar.

GENOTIPO	°BRIX	ACIDEZ TITULABLE (%)	ÍNDICE SABOR
MT	5,45 \pm 0,18	0,60 \pm 0,01	9,08 \pm 0,34
MT TR 15e	8,53 \pm 0,45 a	0,54 \pm 0,01 a	15,80 \pm 0,26 a
MT TR 1f	7,73 \pm 0,27 a	0,57 \pm 0,01 a	13,56 \pm 0,41 a
MT TR 1d	7,18 \pm 0,20 a	0,59 \pm 0,02	12,17 \pm 0,27 a
MT TR 9L	7,68 \pm 0,36 a	0,60 \pm 0,02	12,80 \pm 0,31 a

cv. p73

El 100% de los genotipos transgénicos evaluados mostraron un índice de sabor mayor al del genotipo silvestre. El genotipo silvestre presentó un índice de sabor de 8,42 (p73) y el testigo interno (p73 TI) de 9,12. Los índices de sabor de los genotipos transgénicos oscilaron dependiendo del genotipo, alcanzando valores comprendidos entre 10,89 y 15,63 (Tabla 21).

Tabla 21. Contenido en sólidos solubles (°Brix), acidez titulable (%) e índice de sabor de frutos de tomate de diferentes genotipos transgénicos, el genotipo silvestre y el testigo interno del cultivar p73. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Los valores de todos los parámetros evaluados se expresan como la media \pm error estándar.

GENOTIPO	°BRIX	ACIDEZ TITULABLE (%)	ÍNDICE DE SABOR
p73	4,55 \pm 0,17	0,54 \pm 0,01	8,42 \pm 0,43
p73 TI	4,65 \pm 0,23	0,51 \pm 0,02	9,12 \pm 0,54
p73 TR1	6,72 \pm 0,39 a	0,43 \pm 0,02 a	15,63 \pm 0,23 a
p73 TR2	5,23 \pm 0,27 a	0,48 \pm 0,01 a	10,89 \pm 0,24 a
p73 TR4	5,73 \pm 0,26 a	0,49 \pm 0,01 a	11,69 \pm 0,33 a
p73 TR7	5,67 \pm 0,32 a	0,50 \pm 0,01 a	11,34 \pm 0,26 a

cv. Moneymaker

En nuestro estudio todos los genotipos transgénicos evaluados presentaron un índice de sabor superior al genotipo silvestre (8,28). Los índices de sabor de los genotipos transgénicos oscilaron entre 8,89 (MMK TR 40.1) y 27,40 (MMK TR 44.1) (Tabla 22). En general, el incremento en el índice de sabor de los frutos de los genotipos transgénicos respecto al de los frutos del genotipo silvestre es el resultado de los valores elevados de °Brix y de la disminución de la acidez titulable que presentan.

Tabla 22. Resultados promedio del contenido en sólidos solubles (°Brix), acidez total (%) e índice de sabor de frutos de tomate de diferentes genotipos del cultivar Moneymaker. La letra "a" indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre. Los valores de todos los parámetros evaluados se expresan como la media \pm error estándar.

GENOTIPO	°BRIX	ACIDEZ TITULABLE (%)	ÍNDICE DE SABOR
MMK	4,14 \pm 0,20	0,50 \pm 0,02	8,28 \pm 0,45
MMK TI 4.2	4,40 \pm 0,85	0,47 \pm 0,03	9,36 \pm 0,72
MMK TI 1.1	4,25 \pm 0,20	0,50 \pm 0,03	8,50 \pm 0,36
MMK TI 6.1	4,50 \pm 0,36	0,47 \pm 0,03	9,57 \pm 0,92
MMK TR 38.1	5,00 \pm 0,01 a	0,44 \pm 0,02 a	11,36 \pm 0,29 a
MMK TR 40.1	4,00 \pm 0,01	0,45 \pm 0,02 a	8,89 \pm 0,35 a
MMK TR 59.1	4,70 \pm 0,21 a	0,42 \pm 0,02 a	11,19 \pm 0,41 a
MMK TR 39.1	6,00 \pm 0,01 a	0,35 \pm 0,01 a	17,14 \pm 0,35 a
MMK TR 48.2	5,00 \pm 0,01 a	0,45 \pm 0,02 a	11,11 \pm 0,28 a
MMK TR 48.1	6,36 \pm 0,37 a	0,53 \pm 0,01	12,00 \pm 0,31 a
MMK TR 44.2	5,00 \pm 0,45 a	0,50 \pm 0,03	10,00 \pm 0,43 a
MMK TR 44.1	5,48 \pm 0,06 a	0,20 \pm 0,02 a	27,40 \pm 0,30 a
MMK TR 67.1	4,88 \pm 0,16 a	0,47 \pm 0,01 a	10,38 \pm 0,22 a
MMK TR 26.1	5,00 \pm 0,02 a	0,46 \pm 0,01 a	10,87 \pm 0,37 a

5.4. Color

El color de la pasta o triturado de tomate se evaluó mediante el colorímetro HunterLab® que sitúa el color en el espacio mediante la definición de tres coordenadas cromáticas del espacio CIE $L^*a^*b^*$, siendo L^* (luminosidad), a^* (contribución del rojo) y b^* (contribución del amarillo); como referencia se utilizó el observador 10° y el iluminante D65. A partir de las coordenadas cromáticas se calcularon atributos cromáticos como el ratio a^*/b^* , C^*_{ab} (croma), h^*_{ab} (tono), la diferencia de color de cada genotipo transgénico respecto al silvestre (ΔE) y el índice de color (TCI) calculado según Yeatman, 1969 (7.4. Materiales y Métodos).

cv. Micro-Tom

La Tabla 23 muestra los valores de las coordenadas cromáticas y de los atributos cromáticos para los diferentes genotipos de este cultivar. En ella, podemos observar que el valor de L^* fue significativamente menor en los genotipos transgénicos que en el silvestre; esto indicaría que los frutos de los genotipos transgénicos presentaron un color más oscuro y menos brillante que los frutos del genotipo silvestre. El ratio a^*/b^* en el genotipo silvestre fue de 1,15; mientras que en los genotipos transgénicos evaluados este ratio fue mayor, oscilando entre 1,31 (MT TR 1f) y 1,48 (MT TR 15e). En los genotipos transgénicos el cociente a^*/b^* es elevado como consecuencia de los valores altos de a^* (indicador de tonalidades rojas) y valores bajos de b^* (indicador de tonalidades amarillas).

Tabla 23. Coordenadas cromáticas (L^* , a^* , b^*) y atributos cromáticos (a^*/b^* , TCI y ΔE) de los diferentes genotipos transgénicos y del genotipo silvestre del cv. Micro-Tom (MT). Cada valor es la media de 5 réplicas biológicas. La letra "a" en cada una de las columnas indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre.

GENOTIPO	L^*	a^*	b^*	a^*/b^*	TCI	ΔE
MT	36,76	37,82	32,86	1,15	31,94	
MT TR 15e	31,54 a	40,23 a	27,24 a	1,48 a	21,35 a	8,05 a
MT TR 1f	33,33 a	39,07 a	29,74 a	1,31 a	25,37 a	4,80 a
MT TR 1d	31,46 a	40,41 a	29,59 a	1,37 a	23,04 a	6,74 a
MT TR 9L	33,14 a	39,60 a	28,06 a	1,41 a	23,48 a	6,27 a

La Croma (C^*_{ab}) fue similar en todos los genotipos estudiados, no observándose diferencias significativas entre unos genotipos y otros; por tanto, todos los frutos presentaron la misma saturación de color (Figura 43A).

El tono angular (h^*_{ab}) y el índice de color del puré fresco del fruto de tomate (TCI) representan el color actual del fruto. Cuando h^*_{ab} alcanza valores de 180° representa a un color verde puro y, cuando el valor se acerca a 0° indica un color rojo puro (Shewfelt, 1988). El TCI representa el color del puré fresco de tomate, de tal manera que, cuanto menor sea este índice más rojo será el puré de tomate evaluado. En nuestro estudio los genotipos transgénicos presentaron valores significativamente menores de h^*_{ab} (Figura 43B) y de TCI (Tabla 23), por tanto, sus frutos son más rojos que los frutos del genotipo silvestre.

Las diferencias de color (ΔE) de los frutos transgénicos respecto a los frutos silvestres fueron positivas alcanzando valores comprendidos entre 4,80 y 8,05. La mayor diferencia de color la mostró el genotipo MT TR 15e; debiéndose al aumento en la concentración de tono rojo ($\Delta a^*=2,41$), a la disminución en la concentración de tono amarillo ($\Delta b^*=-5,62$) y a la disminución de la luminosidad ($\Delta L^*=-5,22$).

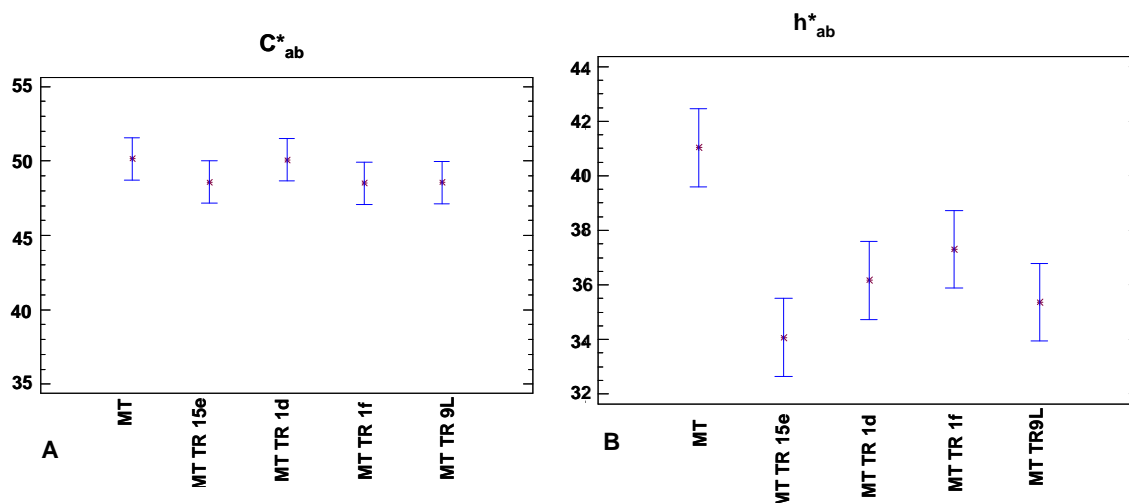


Figura 43. Comparaciones múltiples con intervalos LSD (diferencia mínima significativa) con un nivel de confianza del 95% para (A) la Croma (C^*_{ab}) y (B) el tono (h^*_{ab}) de los genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. Micro-Tom.

cv. p73

La Tabla 24 muestra los valores de las coordenadas cromáticas del sistema CIELAB (L^* , a^* y b^*) y los atributos cromáticos (a^*/b^* , índice de color (TCI) y la diferencia de color (ΔE)) para el cv. p73.

En lo que respecta al valor de L^* únicamente el genotipo transgénico p73 TR1 presentó un valor de este parámetro significativamente menor que el genotipo silvestre indicando que sus frutos tienen menor brillo y, por tanto, son más oscuros. El resto de genotipos transgénicos no presentó diferencias significativas respecto al genotipo silvestre para este parámetro, siendo los frutos de estos genotipos igual de brillantes que los del genotipo silvestre. Los valores del ratio a^*/b^* fueron iguales en los genotipos transgénicos y en el genotipo silvestre del cv. p73; por tanto, los frutos de los genotipos transgénicos mantienen la misma proporción entre el color rojo y el color amarillo que los frutos de los genotipos silvestres.

Tabla 24. Coordenadas cromáticas (L^* , a^* , b^*) y atributos cromáticos (a^*/b^* , TCI y ΔE) de los diferentes genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. p73. Cada valor es la media de 5 réplicas biológicas. La letra "a" en cada una de las columnas indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre.

GENOTIPO	L^*	a^*	b^*	a^*/b^*	TCI	ΔE
p73	40,34	35,31	26,77	1,32	30,58	
p73 TI	39,69	35,21	26,68	1,32	30,07	0,67
p73 TR1	39,90 a	35,26	25,90	1,36	29,31	0,98
p73 TR2	40,00	35,13	27,10	1,30	30,86	0,51
p73 TR4	39,98	34,10 a	25,46	1,34	29,85	1,83
p73 TR7	40,13	34,00 a	26,53	1,28	31,31	1,35

El valor de la Croma (C_{ab}^*) fue significativamente menor en los genotipos transgénicos p73 TR1, p73 TR4 y p73 TR7, que presentaron frutos con colores más apagados (menos vivos) que los silvestres; el genotipo transgénico p73 TR2 no presentó diferencias significativas frente al silvestre (Figura 44A).

Respecto al tono angular (h_{ab}^*) y al índice de color del fruto (TCI) cabe mencionar que no se observaron diferencias significativas entre los frutos de los genotipos transgénicos y los silvestres; por tanto, los frutos de los genotipos transgénicos son igual de rojos que los de los genotipos silvestres. Las diferencias de color (ΔE) entre los frutos transgénicos y los frutos silvestres alcanzaron valores comprendidos entre 0,51 (p73 TR2) y 1,83 (p73 TR4), pero, éstas no han sido significativas. La máxima diferencia de color la mostró el genotipo p73 TR4 y fue debida a la disminución en la concentración de tono rojo ($\Delta a^* = -1,21$), a la disminución en la concentración de tono amarillo ($\Delta b^* = -1,32$) y de la luminosidad ($\Delta L^* = -0,36$).

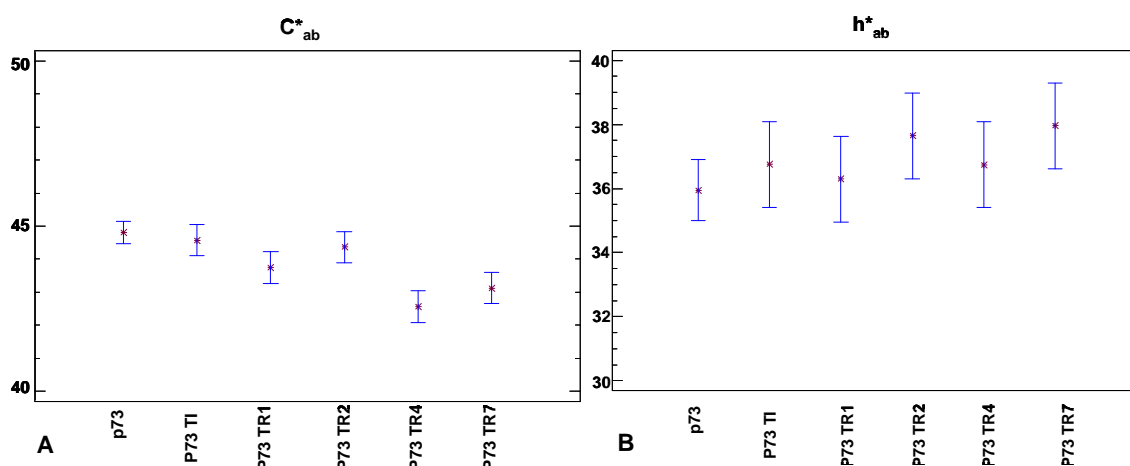


Figura 44. Comparaciones múltiples con intervalos LSD (diferencia mínima significativa) con un nivel de confianza del 95% para (A) la Croma (C_{ab}^*) y (B) el tono (h_{ab}^*) de los genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. p73.

cv. Moneymaker

En lo que respecta al parámetro L^* , el 70% de los genotipos transgénicos no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al genotipo silvestre. Los únicos genotipos que difirieron del genotipo silvestre fueron MMK 38.1, MMK TR 44.2 y MMK TR 44.1. Los dos primeros presentaron valores de L^* inferiores que el genotipo silvestre, por lo que los frutos de estos dos genotipos transgénicos son menos brillantes y más oscuros. El último presentó un valor de L^* mayor que el

silvestre; por tanto, sus frutos tienen más brillo y son más claros que los frutos silvestres.

Las diferencias entre el ratio a^*/b^* fueron significativas en el 70% de los genotipos transgénicos (MMK TR 59.1, MMK TR 39.1, MMK TR 44.1, MMK TR 48.1, MMK TR 44.2, MMK TR 67.1 y MMK TR 38.1). En los tres primeros, la proporción entre el color rojo y amarillo fue menor que en el genotipo silvestre, mientras que, en los cuatro últimos, la proporción entre el color rojo y el amarillo fue mayor que en el silvestre. El 30% restante de genotipos transgénicos no mostraron diferencias significativas respecto al silvestre para este parámetro.

Tabla 25. Coordenadas cromáticas (L^* , a^* , b^*) y atributos cromáticos (a^*/b^* , TCI y ΔE) de los diferentes genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. Moneymaker. Cada valor es la media de 5 réplicas biológicas. La letra "a" en cada una de las columnas indica diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ de los diferentes genotipos evaluados respecto al silvestre.

GENOTIPO	L^*	a^*	b^*	a^*/b^*	TCI	ΔE
MMK	50,15	32,54	26,67	1,22	41,10	
MM TI 4.2	47,96	31,52	26,60	1,18	40,47	2,42
MMK TI 1.1	55,47	29,78	25,30	1,18	47,13	6,14
MMK TI 6.1	57,12	31,62	24,09	1,31	43,52	7,49
MMK TR 38.1	43,02 a	38,09 a	29,91 a	1,27 a	33,78 a	9,60 a
MMK TR 40.1	47,01	34,06 a	28,96 a	1,18	39,97	4,17
MMK TR 59.1	49,75	35,04 a	31,35 a	1,12 a	44,51 a	5,32
MMK TR 39.1	49,50	34,06 a	32,28 a	1,06 a	46,91 a	5,85
MMK TR 48.2	50,86	33,00	25,27	1,31	38,95	1,64
MMK TR 48.1	47,98	35,16 a	25,04	1,40 a	34,17 a	3,77
MMK TR 44.2	42,79 a	39,04 a	27,12 a	1,44 a	29,73 a	9,83 a
MMK TR 44.1	55,25 a	30,68	28,80 a	1,07 a	51,86 a	5,83
MMK TR 67.1	50,82	32,81	24,14 a	1,36 a	37,39 a	7,43 a
MMK TR 26.1	51,09	34,68	26,94	1,29	39,69	2,35

Respecto a la Croma (C^*_{ab}) sólo se observaron diferencias significativas entre los frutos del genotipo transgénico MMK TR 38.1 y los del genotipo silvestre (Figura 45A); para este genotipo transgénico el valor de C^*_{ab} fue mayor que para el genotipo silvestre, lo que significa que sus frutos presentaron un color más saturado que éste. El resto de genotipos transgénicos no mostraron diferencias significativas respecto al silvestre.

En cuanto al tono angular (h^*_{ab}), los frutos del 30% de los genotipos transgénicos (MMK TR 59.1, MMK TR 39.1, MMK TR 44.1) mostraron valores de tono angular (Figura 45B) y TCI (Tabla 25) superiores a los de los frutos del genotipo silvestre. Los valores de estos dos parámetros (h^*_{ab} y TCI) nos indican que los frutos de estos genotipos presentaron una tonalidad más anaranjada que la mostrada por los frutos silvestres. Por el contrario, los frutos de los genotipos MMK TR 38.1, MMK TR 48.1, MMK TR 44.2 y MMK TR 67.1 presentaron valores de h^*_{ab} y TCI significativamente menores que los frutos del genotipo

silvestre, lo que indica que en estos cuatro genotipos transgénicos, los frutos son más rojos que los del silvestre.

El resto de genotipos transgénicos no presentaron diferencias significativas respecto a los genotipos silvestres para estos parámetros, indicando que los frutos de estos genotipos transgénicos presentan un color rojo similar al de los frutos del genotipo silvestre.

Las mayores diferencias de color se han encontrado en los genotipos MMK TR 38.1 y MMK TR 44.2. Para ambos genotipos las ΔE se deben al aumento en la concentración de tono rojo ($\Delta a^* = 5,55$ para el primero y $\Delta a^* = 6,5$ para el segundo) y amarillo ($\Delta b^* = 3,24$ para el primero y $\Delta b^* = 0,45$ para el segundo) y a la disminución de la luminosidad ($\Delta L^* = -7,13$ para el primero y $\Delta L^* = -7,36$ para el segundo).

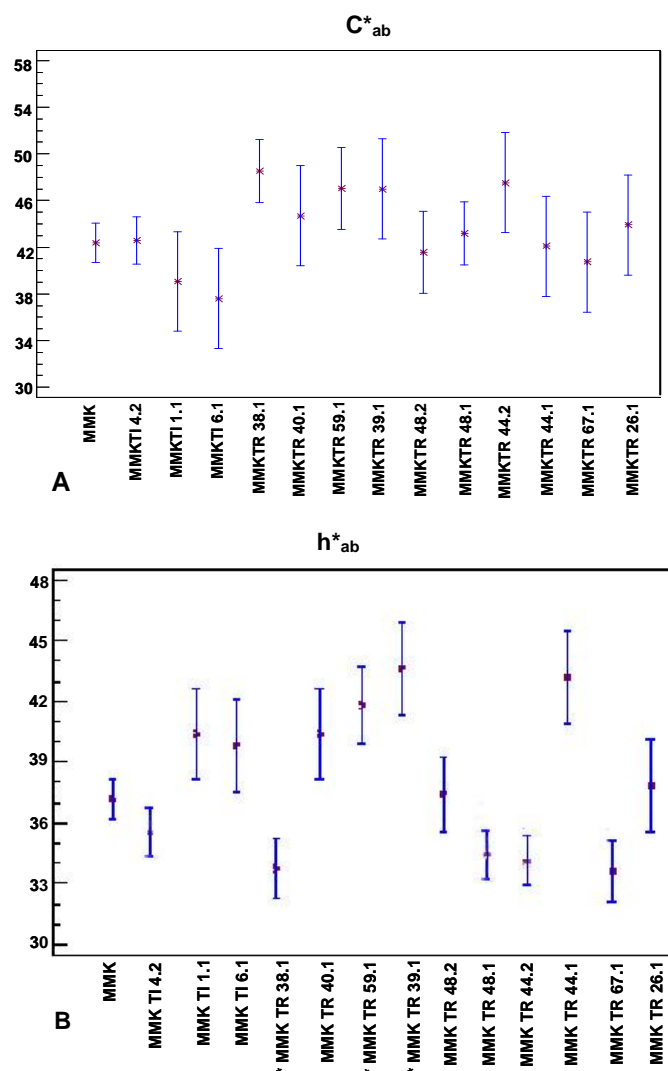


Figura 45. Comparaciones múltiples con intervalos LSD (diferencia mínima significativa) con un nivel de confianza del 95% para (A) la Croma (C^*_{ab}) y (B) el tono (h^*_{ab}) de los genotipos transgénicos y el genotipo silvestre del cv. Moneymaker.

5.5. Análisis de compuestos volátiles de los genotipos *PsEND1::barnasa* mediante GC-MS

En este apartado, se describe el perfil aromático de los frutos de 8 genotipos transgénicos independientes de tomate (MMK TR 67.1, MMK TR 40.1, MMK TR 48.1, MMK TR 48.2, MMK TR 59.1, MMK TR 26.1, MMK TR 38.1 y MMK TR 39.1); 2 genotipos testigos internos de la transformación genética (MMK TI 1.1 y MMK TI 6.1) y el genotipo silvestre (MMK). La finalidad del análisis es caracterizar el contenido en compuestos volátiles de los frutos de los distintos genotipos transgénicos seleccionados y compararlos con el contenido de compuestos volátiles de los frutos de plantas silvestres.

La metodología analítica utilizada fue la Cromatografía de Gases con detección mediante Espectrometría de Masas (GC-MS). Para la captura de volátiles se utilizó la técnica de la Microextracción en Fase Sólida sobre el Espacio de Cabeza (7.5.3. Materiales y Métodos).

5.5.1. Identificación de compuestos volátiles en frutos de tomate

En el Anexo I se detallan las abundancias relativas de los 53 compuestos de la fracción volátil que fueron identificados en los frutos de todos los genotipos evaluados en el estadio rojo maduro. Todos los compuestos detectados se encuentran entre los citados en la bibliografía como componentes del aroma del tomate (Buttery *et al.*, 1990, Marlatt *et al.*, 1992; Buttery, 1993; Langlois *et al.*, 1996; Krumbein y Auerswald, 1998; Baldwin *et al.*, 2000). Se trata de aldehídos, cetonas, alcoholes y terpenos. La Figura 46 muestra dos cromatogramas tipo de la fracción volátil libre de un fruto de tomate silvestre y de un fruto de tomate perteneciente al genotipo transgénico MMK TR 39.1, obtenidos por microextracción en fase sólida en espacio de cabeza acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).

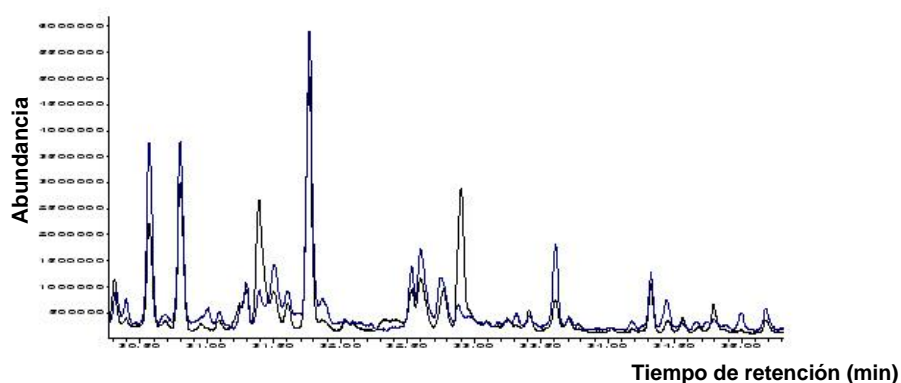


Figura 46. Cromatograma (HS-SPME-GC-MS). Se representa la fracción volátil libre de un tomate silvestre (negro) y la de un tomate transgénico (MMK TR 39.1) (azul) del cv. Moneymaker obtenidos a partir del pericarpo de los mismos.

Las identificaciones de los picos cromatográficos se realizaron por contraste con los espectros de masas de la biblioteca NIST 2005 (US National Institute of Standards and Technology) y posteriormente fueron confirmadas con los tiempos de retención de sus estándares comerciales. Los compuestos volátiles identificados son derivados del metabolismo de lípidos, derivados de aminoácidos (leucina, isoleucina), derivados de la degradación de carotenoides y compuestos fenólicos y (Grasselly *et al.*, 2000; Saliba Colombani *et al.*, 2001).

5.5.2. Separación de los genotipos *PsEND1::barnasa* en base a su perfil de volátiles

Como aproximación al análisis de datos de las evaluaciones realizadas sobre el contenido de compuestos volátiles en los diferentes genotipos transgénicos y en el genotipo silvestre, se realizó un análisis de la distribución de la variabilidad de los datos mediante PCA (Principal Component Analysis).

En primer lugar se llevó a cabo un PCA sobre los compuestos volátiles evaluados para cada una de las cinco réplicas biológicas correspondientes a cada genotipo evaluado. Este análisis nos muestra una idea general de la variabilidad de las réplicas biológicas dentro de un mismo genotipo, permitiéndonos desechar alguna de ellas en caso de que su comportamiento sea extraño. Después, se repitió el análisis PCA pero representando los valores promedio de los datos de abundancia de cada uno de los volátiles en cada uno de los genotipos (Figura 47). Este análisis de componentes principales indicó que las dos primeras componentes explican el 63,6% de la variabilidad total existente (siendo la primera componente la que mayor variabilidad explica (36,9%) seguida de la segunda componente (26,7%)). Si atendemos a la primera componente, los genotipos más extremos (cuyo contenido en compuestos volátiles más se aleja del genotipo silvestre) fueron los genotipos MMK TR 39.1, MMK TR 59.1 y MMK TR 26.1; estos genotipos difirieron significativamente en 18, 15 y 6 compuestos respectivamente.

Si nos fijamos en la segunda componente, los genotipos que más difieren del silvestre son MMK TR 59.1 y MMK TR 38.1; estos genotipos difirieron significativamente respecto al silvestre en 15 y 10 compuestos, respectivamente.

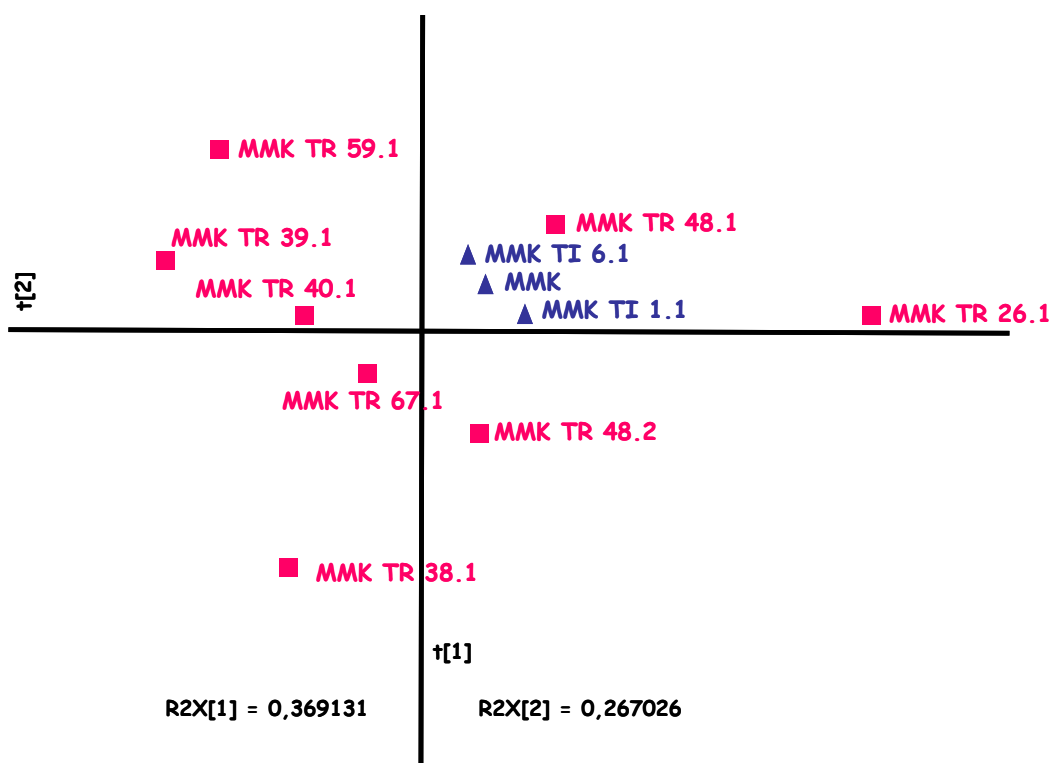


Figura 47. Análisis de componentes principales (PCA) de los 8 genotipos transgénicos de tomate, los genotipos silvestres utilizados como testigos internos de la transformación (MMK TI 1.1 y MMK TI 6.1) y el genotipo silvestre (MMK). Se muestran las dos primeras componentes principales; la primera componente explica el 36,9% de la varianza y la segunda un 26,7%.

La separación anterior de los genotipos estudiados se debe a la distribución de los compuestos volátiles evaluados; en la Figura 48 se muestra el análisis discriminante para los 27 compuestos volátiles que resultaron significativos en el análisis. Considerando las dos primeras componentes principales como ejes, el PCA permitió clasificar los compuestos volátiles en diferentes grupos que se ajustan bastante bien al origen metabólico del cual proceden (compuestos derivados de la degradación de pigmentos carotenoides, derivados de lípidos, derivados de aminoácidos como leucina e isoleucina y compuestos fenólicos).

Si atendemos a la primera componente (capaz de explicar el 36,9% de la variabilidad total existente), se observó que los volátiles derivados de lípidos y los volátiles derivados de aminoácidos (leucina e isoleucina) se agrupan bien diferenciándose claramente del resto. Si observamos la segunda componente, que explica el 26,7% de la variabilidad total, podríamos decir que existe otro grupo diferenciado formado por la mayoría de los volátiles derivados de carotenoides. Los compuestos fenólicos no se diferenciaron con tanta claridad del resto de grupos.

Este análisis permite la identificación de diversos compuestos volátiles que son determinantes a la hora de determinar la similitud o diversidad existente entre los genotipos evaluados y, sobre todo, permite la asociación entre genotipos y compuestos volátiles. Así pues, el PCA de los compuestos volátiles sugiere que las diferencias encontradas entre los genotipos MMK TR 39.1, MMK TR 59.1, MMK TR 38.1, y el genotipo silvestre se deben a compuestos como geranial, 6-metil-5-hepten-2-ona, geranilacetona, (E)-2-pentenal, 3-metilbutanonitrilo, 3-metilbutanol, eugenol, guayacol y 1-penten-3-ona. Mientras que, las diferencias encontradas entre el genotipo MMK 26.1 y el genotipo silvestre sean debidas a compuestos como (E)-2-metil-2-butenal, benzaldehído, terpineol, etc.

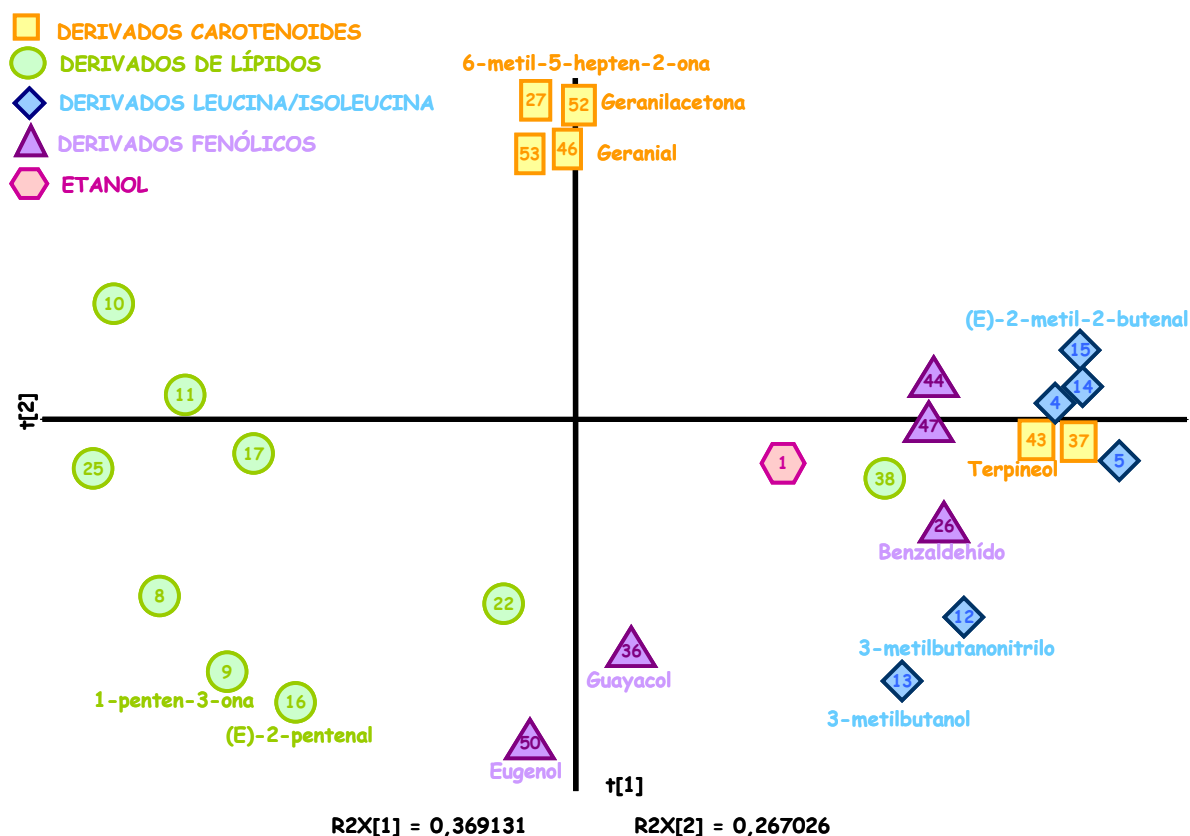


Figura 48. Representación gráfica de las dos primeras componentes principales (PCA) para los 27 compuestos volátiles que fueron significativos en nuestro análisis. La primera componente incluye el 36,9% de la varianza y el segundo un 26,7%. Cada número corresponde a un compuesto volátil; la correspondencia entre los números y los compuestos volátiles se muestra en el Anexo I.

5.5.3. Análisis de los compuestos volátiles significativos en los genotipos MMK TR 39.1, MMK TR 59.1, MMK TR 26.1 y MMK TR 38.1

En las Figuras 49 y 50 se representan los compuestos volátiles que resultaron significativos al comparar la fracción volátil de los genotipos transgénicos MMK TR 39.1, MMK TR 59.1, MMK TR 26.1 y MMK TR 38.1 frente a la fracción volátil del genotipo silvestre. Los compuestos derivados de carotenoides se representan en color amarillo, los compuestos derivados de lípidos se representan en color verde, los compuestos fenólicos se representan en color morado, los compuestos derivados de la leucina e isoleucina se representan en color azul y, el etanol en color rosa. En cada uno de los grupos de volátiles, el color claro identifica el genotipo silvestre y el color oscuro identifica al genotipo transgénico.

Comparación entre el genotipo MMK TR 39.1 y el genotipo silvestre

La Figura 49 A muestra los 18 compuestos que resultaron significativos al comparar la fracción volátil del genotipo MMK TR 39.1 y el genotipo silvestre. Estos compuestos fueron: etanol, 2 compuestos derivados de carotenoides (6-metil-5-hepten-2-ona y geranial), 7 compuestos derivados de lípidos (1-penten-3-ol, 1-penten-3-ona, (E) -2-pentenal, (E)-2-hexenal, (E)-2-heptenal, (E)-2-octenal y (E,E)-2,4-decadienal), 4 compuestos fenólicos (acetofenona, metilsalicilato, etilsalicilato y 1-nitro-2-feniletano) y 4 compuestos derivados de la leucina e isoleucina (3-metilbutanal, 3-metilbutanonitrilo, 3-metilbutanol y 2-metil-1-butanol).

El genotipo transgénico presentó un nivel de etanol significativamente menor que el genotipo silvestre. Los niveles de los compuestos derivados de carotenoides y de lípidos fueron mayores en el genotipo transgénico que en el silvestre; al igual que el 1-nitro-2-feniletano y la acetofenona (compuestos fenólicos). Otros compuestos fenólicos (metilsalicilato y etilsalicilato) fueron menos abundantes en el genotipo transgénico que en el silvestre. En lo que respecta a los compuestos derivados de la leucina e isoleucina, todos ellos presentaron niveles inferiores en el genotipo transgénico que en el silvestre.

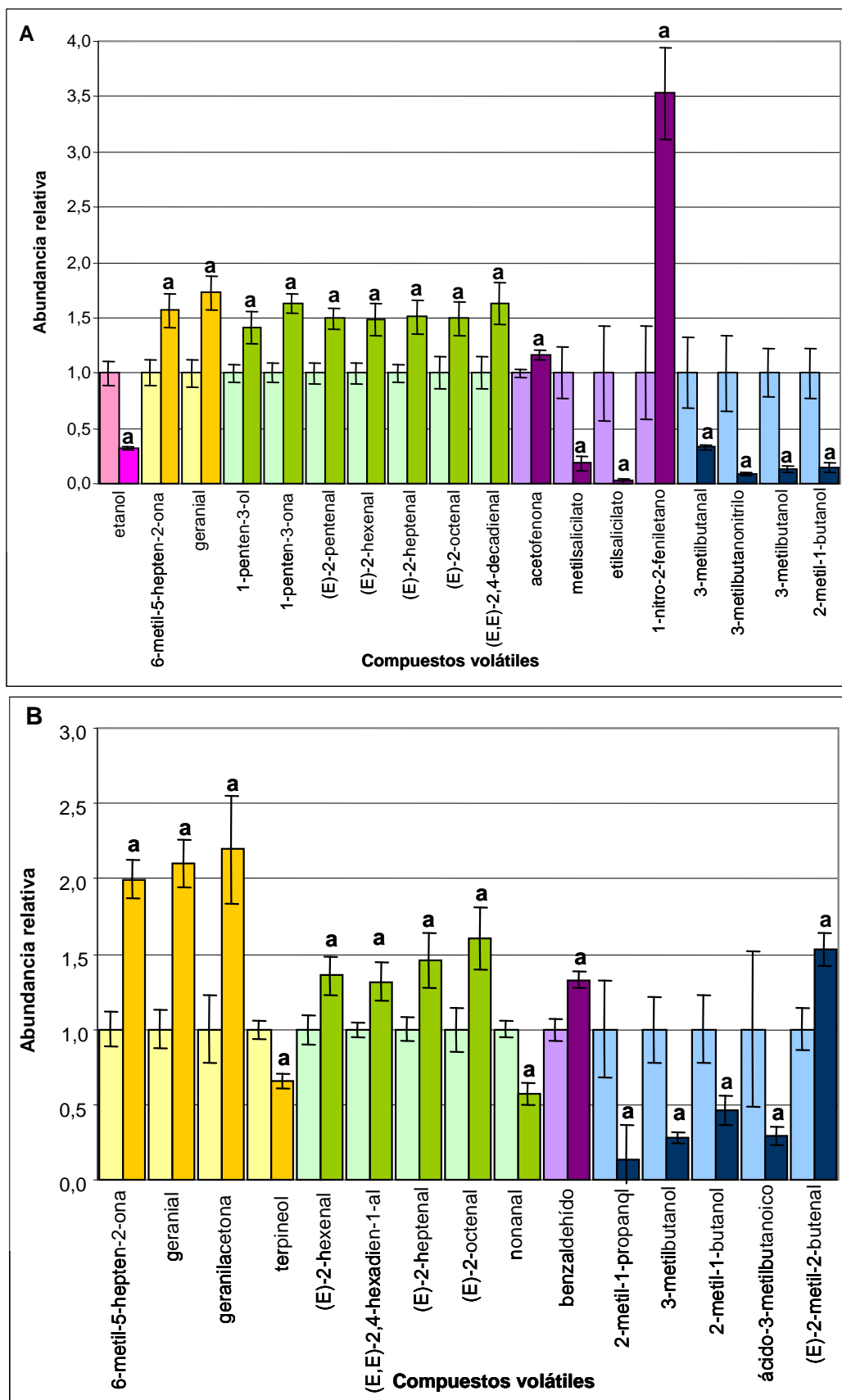


Figura 49. Concentración de los compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre los genotipos transgénicos MMK TR 39.1, MMK TR 59.1 y el genotipo silvestre. (A) MMK TR 39.1 (barras en colores oscuros) y el genotipo silvestre (barras en colores claros). (B) MMK TR 59.1 (barras en colores oscuros) y el genotipo silvestre (barras en colores claros). Valores medios y errores estándar.

Comparación entre el genotipo MMK TR 59.1 y el genotipo silvestre

La Figura 49 B muestra los 15 compuestos que resultaron significativos al comparar la fracción volátil del genotipo MMK TR 59.1 y el genotipo silvestre. Estos compuestos fueron: 4 compuestos derivados de carotenoides: 6-metil-5-hepten-2-ona, geranial, geranilacetona y terpineol, los tres primeros fueron más abundantes en el genotipo transgénico que en el silvestre mientras que el último fue menos abundante en el genotipo transgénico que en el silvestre; 5 compuestos derivados de lípidos ((E)-2-hexenal, (E,E)-2,4-hexadien-1-al, (E)-2-heptenal, (E)-2-octenal y nonanal), todos ellos fueron más abundantes en el genotipo transgénico que en el silvestre, a excepción del nonanal, que disminuyó en el transgénico. Sólo un compuesto fenólico resultó ser significativo, el benzaldehído, que resultó ser más abundante en el genotipo transgénico que en el silvestre. Por último 5 compuestos derivados de la leucina o isoleucina resultaron significativos respecto al genotipo silvestre, 4 de ellos (2-metil-1-propanol, 3-metilbutanol, 2-metil-1-butanol y ácido 3-metilbutanoico), presentaron niveles inferiores en el genotipo transgénico que en el silvestre y uno de ellos, (E)-2-metil-2-butenal, presentó un nivel superior en el genotipo transgénico que en el silvestre.

Comparación entre el genotipo MMK TR 26.1 y el genotipo silvestre

La Figura 50 A muestra los 6 compuestos (6-metil-5-hepten-2-ona, terpineol, (E)-2-octenal, (E,E)-2,4-decadienal, benzaldehído y (E)-2-metil-2-butenal) que resultaron significativos al comparar la fracción volátil del genotipo MMK TR 26.1 con el genotipo silvestre; todos ellos resultaron ser más abundantes en el genotipo transgénico que en el silvestre.

Comparación entre el genotipo MMK TR 38.1 y el genotipo silvestre

La Figura 50 B los 10 compuestos que resultaron significativos al comparar la fracción volátil del genotipo MMK TR 38.1 y el genotipo silvestre. Estos compuestos fueron: derivados de lípidos (1-penten-3-ol, 1-penten-3-ona y (E)-2-heptenal), que aumentaron en el transgénico respecto al silvestre y el nonanal (que disminuyó en el transgénico respecto al silvestre); compuestos fenólicos (benzaldehído, guayacol y eugenol, que resultaron ser más abundantes en el genotipo transgénico que en el silvestre y el metilsalicilato (que fue menos abundante en el genotipo transgénico que en el silvestre). Sólo dos compuestos derivados de la leucina o isoleucina resultaron ser

significativos en este genotipo transgénico y fueron 3-metilbutanol (más abundante en el transgénico que en el silvestre) y 2-metil-1-butanol (menos abundante en el transgénico que en el silvestre).

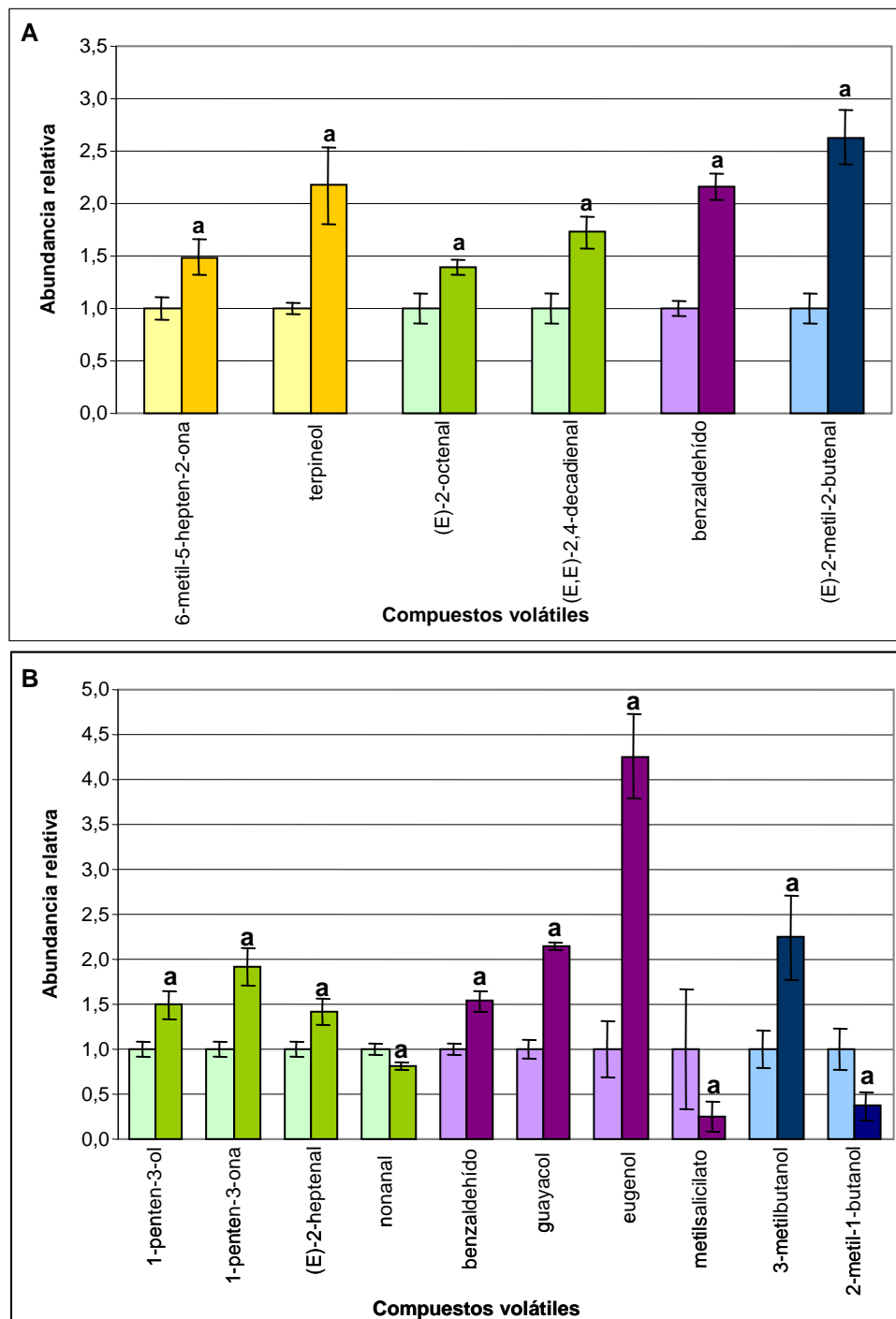


Figura 50. Concentración de los compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre los genotipos transgénicos MMK TR 26.1 y MMK TR 38.1 y el genotipo silvestre. (A) MMK TR 26.1 (barras en colores oscuros) y el genotipo silvestre (barras en colores claros). (B) MMK TR 38.1 (barras en colores oscuros) y el genotipo silvestre (barras en colores claros). Valores medios y errores estándar.

En relación con los resultados expuestos anteriormente podemos decir que en los cuatro genotipos estudiados los compuestos derivados de carotenoides (6-metil-5-hepten-2-ona, geranial, geranilacetona y terpineol) fueron (a excepción del terpineol) significativamente más abundantes en los genotipos transgénicos que en los genotipos silvestres. Se trata de compuestos asociados a notas florales y frutales del aroma (Marais, 1983; Knudsen *et al.*, 1993; Krumbein y Auerswald, 1998; Burdock, 2002; Lewinsohn *et al.*, 2005b). Por tanto, los frutos de estos genotipos transgénicos podrían tener un aroma más floral y frutal que los frutos del genotipo silvestre. Los compuestos volátiles derivados de lípidos (1-penten-3-ol, 1-penten-3-ona, (E)-2-pentenal, (E)-2-hexenal, (E)-2-heptenal y (E)-2-octenal, (E,E)-2,4-hexadien-1-al y nonanal) fueron (a excepción del nonanal) significativamente más abundantes en los frutos de los genotipos transgénicos que en los silvestres. Se trata de compuestos asociados a notas frescas, notas frutales y, sobre todo notas “verdes” (Baldwin *et al.*, 1998; Baldwin *et al.*, 2004); por este motivo, los frutos de los genotipos transgénicos podrían presentar aromas con notas más frescas y verdes que los de los frutos de los genotipos silvestres.

Los compuestos fenólicos (1-nitro-2-feniletano, acetofenona, benzaldehído, eugenol y guayacol) fueron significativamente más abundantes en los frutos de los genotipos transgénicos que en los frutos del genotipo silvestre; algunos de estos compuestos han sido descritos por su contribución con notas florales y frutales al aroma (Marais, 1983; Knudsen *et al.*, 1993; Krumbein y Auerswald, 1998; Burdock, 2002; Lewinsohn *et al.*, 2005b) y por potenciar la sensación de dulzor del fruto (Baldwin *et al.*, 2004). Como excepción cabe mencionar el guayacol; este compuesto ha sido descrito como indeseable en los frutos puesto que está asociado con aromas farmacéuticos (Zierler *et al.*, 2004). También hemos encontrado otros compuestos volátiles fenólicos (metilsalicilato y etilsalicilato) que fueron significativamente menos abundantes en los frutos de los genotipos transgénicos que en los del genotipo silvestre y que están asociados a estadios inmaduros o verdes del fruto (menos apreciados organolépticamente en tomate); por tanto, esta disminución sería interesante para el aroma del fruto de tomate.

Los compuestos derivados de leucina e isoleucina, en nuestro caso, se han comportado de manera diferente en unos genotipos y otros. En los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 los compuestos (3-metilbutanal, 3-metilbutanonitrilo, 3-metilbutanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol y ácido 3-metilbutanoico) han disminuido significativamente respecto a los genotipos silvestres; se trata de compuestos que aportan sensación de estancamiento o de ambiente viciado, de acre o picante y de alcohol (Tandon *et al.*, 2000). El único compuesto que ha aumentado en

el genotipo transgénico MMK TR 59.1 es el (E)-2-metil-2-butenal; este compuesto también resultó ser significativamente mayor en el genotipo MMK TR 26.1 y está asociado a notas de malta.

En el genotipo MMK TR 38.1 dos compuestos fueron significativos: 3-metilbutanol (asociado a notas frescas), que aumentó en el genotipo transgénico respecto al silvestre y 2-metil-1-butanol (asociado con olor a alcohol), que disminuyó en el genotipo transgénico respecto al silvestre. Por tanto, los frutos de estos genotipos podrían tener aromas con notas frescas y con menor sensación a alcohol.

5.6. Análisis de metabolitos primarios en los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 mediante GC-MS

El sabor del tomate es fruto de las interacciones que se establecen entre azúcares reductores (principalmente fructosa y glucosa), los ácidos libres (principalmente el ácido cítrico y el ácido málico), los aminoácidos libres (principalmente el ácido glutámico y ácido aspártico), los minerales (principalmente fosfato y potasio) y los cientos de compuestos volátiles presentes en este fruto. Algunos autores han otorgado mayor importancia relativa a los azúcares y ácidos (Stevens *et al.*, 1979; Jones y Scott, 1984; Malundo *et al.*, 1995) y otros a los compuestos volátiles (Buttery *et al.*, 1987; Krumbein y Auerswald, 1998; Brauss *et al.*, 1998; Berna *et al.*, 2005b). Aminoácidos y minerales ejercen una contribución más sutil sobre el sabor del fruto.

5.6.1. Identificación de metabolitos primarios

En el Anexo II se detallan las abundancias relativas de los 26 metabolitos primarios identificados en los frutos de los 2 genotipos transgénicos del cv. MoneyMaker (MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1) respecto al genotipo silvestre. Se han escogido estos dos genotipos transgénicos por ser los que más diferencias mostraron, respecto al silvestre, en el contenido de compuestos volátiles evaluados en el estadio de maduración denominado rojo maduro. Entre los compuestos detectados se encuentran aminoácidos, ácidos y azúcares.

5.6.2. Separación de los genotipos *PsEND1::barnasa* en base a su perfil de metabolitos primarios

Como aproximación al análisis de datos de las evaluaciones realizadas sobre el contenido de metabolitos primarios en los frutos de los genotipos transgénicos y en el

genotipo silvestre, se realizó un análisis de la distribución de la variabilidad de los datos mediante PCA. El PCA se realizó sobre los metabolitos evaluados en cada una de las 5 réplicas biológicas que se llevaron a cabo con cada uno de ellos (Figura 51); con esta representación se muestran, tanto las diferencias existentes entre genotipos, como la variabilidad existente entre las diferentes réplicas biológicas pertenecientes a un mismo genotipo.

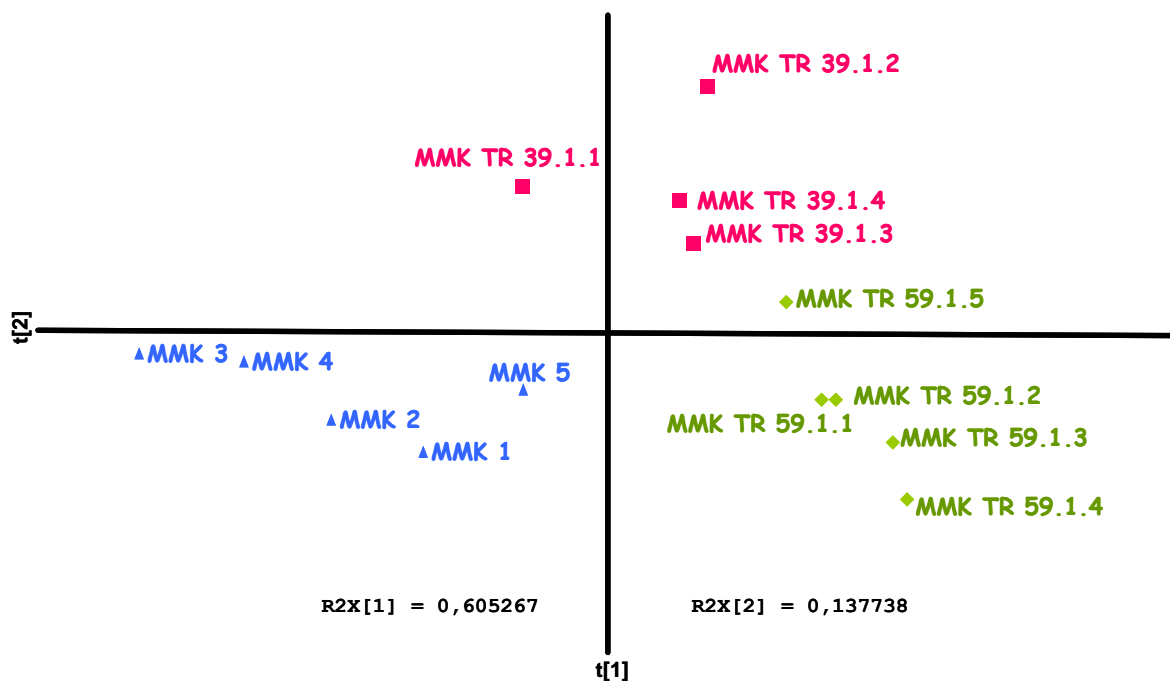


Figura 51. Análisis de componentes principales (PCA) para las dos primeras componentes principales de las réplicas biológicas pertenecientes a los 2 genotipos transgénicos de tomate y el genotipo silvestre. La primera componente explica el 60,5% de la varianza y la segunda un 13,8%.

Este análisis de componentes principales indicó que las dos primeras componentes explican el 74,3% de la variabilidad total existente, siendo la primera componente la que mayor variabilidad explica (60,5%) seguida de la segunda componente (13,8%). Si atendemos a la primera componente, los tres genotipos se diferencian entre ellos, siendo, el genotipo silvestre (MMK) más similar al genotipo MMK TR 39.1 que al genotipo MMK TR 59.1. Si observamos la segunda componente, vemos que existen algunos metabolitos que hacen que, en esta componente el genotipo MMK TR 59.1 sea más parecido al genotipo silvestre (MMK) que el genotipo MMK TR 39.1.

La separación anterior de los genotipos estudiados se debe a la distribución de los metabolitos primarios evaluados; por ello, si observamos el análisis de componentes principales con los metabolitos analizados en los genotipos transgénicos (MMK TR

39.1 y MMK TR 59.1) y en el genotipo silvestre (Figura 52) vemos que existen metabolitos responsables de las diferencias entre los genotipos estudiados.

La primera componente, que explica el 60,5% de la variabilidad total existente, es capaz de diferenciar los dos genotipos transgénicos del genotipo silvestre; en esta diferenciación están implicados metabolitos como el ácido adípico y el grupo de metabolitos que se encuentran en la parte positiva del eje de abscisas (Figura 52). La segunda componente, que explica el 13,8% de la variabilidad total existente, es capaz de diferenciar el genotipo transgénico MMK TR 59.1 (más similar al silvestre) del genotipo MMK TR 39.1. Esta diferenciación se debe a metabolitos como el ácido cítrico, el ácido málico y la putrescina.

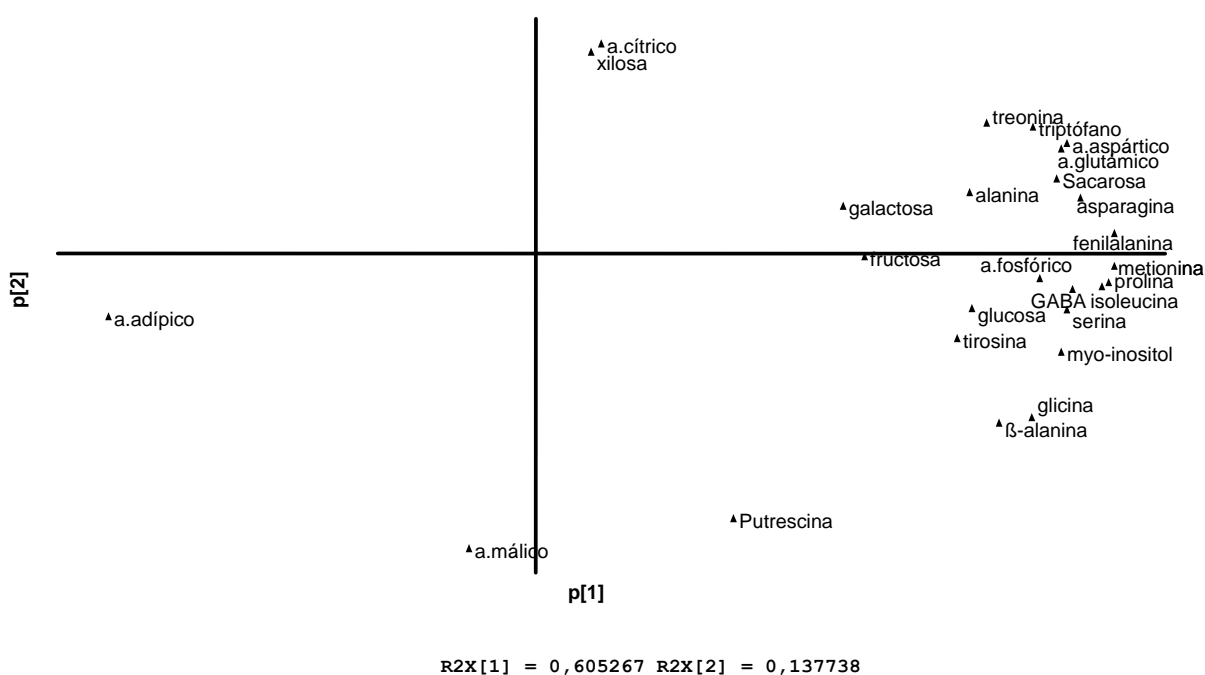


Figura 52. Representación gráfica de las dos primeras componentes principales (PCA) para los 26 metabolitos primarios identificados. La primera componente, que explica el 60,5% de la varianza y la segunda, que explica un 13,8%.

5.6.3. Análisis de los metabolitos primarios en los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1

Comparación entre el genotipo MMK TR 39.1 y el genotipo silvestre

La Figura 53 muestra la abundancia relativa de los metabolitos identificados en los frutos del genotipo MMK TR 39.1 respecto a los frutos del genotipo silvestre así como

las diferencias estadísticamente significativas encontradas entre los aminoácidos y putrescina (A), ácidos (B) y azúcares (C).

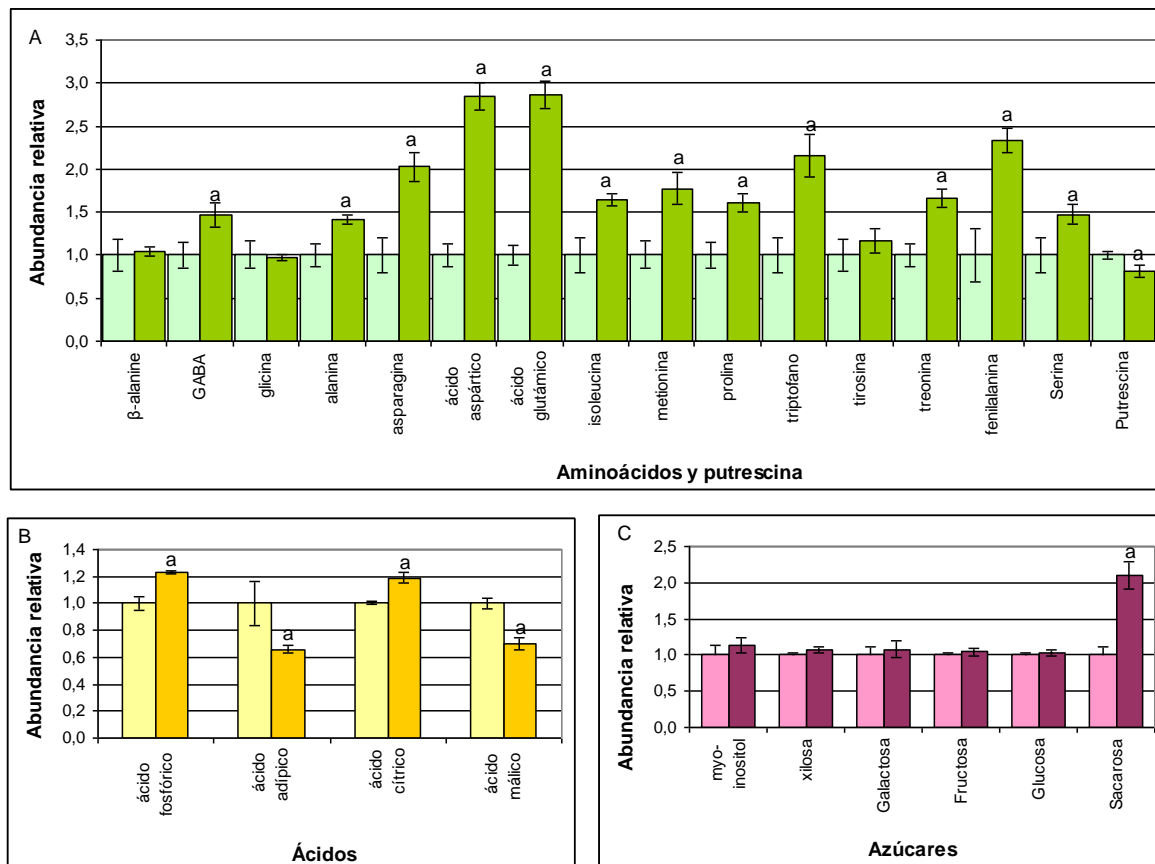


Figura 53. Valores relativos de los metabolitos primarios analizados en los frutos del genotipo MMK 39.1 respecto a los frutos del genotipo silvestre. (A) Abundancia de aminoácidos y putrescina (barras de color verde). (B) Abundancia de ácidos (barras de color amarillo). (C) Abundancia de azúcares (barras de color rosa). Los datos se han normalizado respecto a la abundancia media calculada para el genotipo silvestre. Cada barra representa la media \pm el error estándar de las cinco réplicas biológicas realizadas con cada genotipo. La letra "a" indica diferencias significativas para $p < 0,05$ del genotipo MMK TR 39.1 (color oscuro) respecto al silvestre (color claro).

El análisis de los metabolitos reveló el aumento de todos los aminoácidos evaluados (a excepción de la β -alanina, glicina y tirosina) en el genotipo MMK 39.1 respecto al silvestre (Figura 53A). La putrescina disminuyó significativamente en los frutos de este genotipo transgénico al compararlo con los frutos del genotipo silvestre.

El contenido de todos los ácidos analizados cambió significativamente en los frutos del genotipo transgénico respecto al presentado por los frutos del genotipo silvestre; algunos de ellos aumentaron en el genotipo transgénico (ácido fosfórico y ácido cítrico) mientras que otros disminuyeron (ácido adípico y ácido málico) (Figura 53B). Con respecto a los azúcares, sólo se observaron diferencias significativas en el contenido de sacarosa, que aumentó en los frutos de este genotipo transgénico respecto al de los frutos del genotipo silvestre (Figura 53C).

El aumento del contenido en aminoácidos es de gran importancia puesto que, por un lado mejora el valor nutritivo y protéico de los frutos y, por otro lado, contribuyen a realzar el sabor de los frutos teniendo un efecto tampón (Bucheli *et al.*, 1999). Los cambios producidos en el contenido de ácidos y azúcares son determinantes en el sabor de los frutos; así pues, niveles elevados de azúcares junto con niveles bajos o moderados de ácidos, están asociados a frutos con buen sabor. Otras combinaciones entre azúcares y ácidos hacen que los frutos sean insípidos o adquieran sabores ácidos. En el genotipo transgénico MMK TR 39.1 se mantiene una buena proporción de azúcares y ácidos, por lo que, en principio podríamos decir que los frutos de este genotipo tienen buen sabor.

Comparación entre el genotipo MMK TR 59.1 y el genotipo silvestre

La Figura 54 muestra la abundancia relativa de los metabolitos identificados en los frutos del genotipo MMK TR 59.1 respecto al genotipo silvestre así como las diferencias estadísticamente significativas encontradas entre los aminoácidos y putrescina (A), ácidos (B) y azúcares (C).

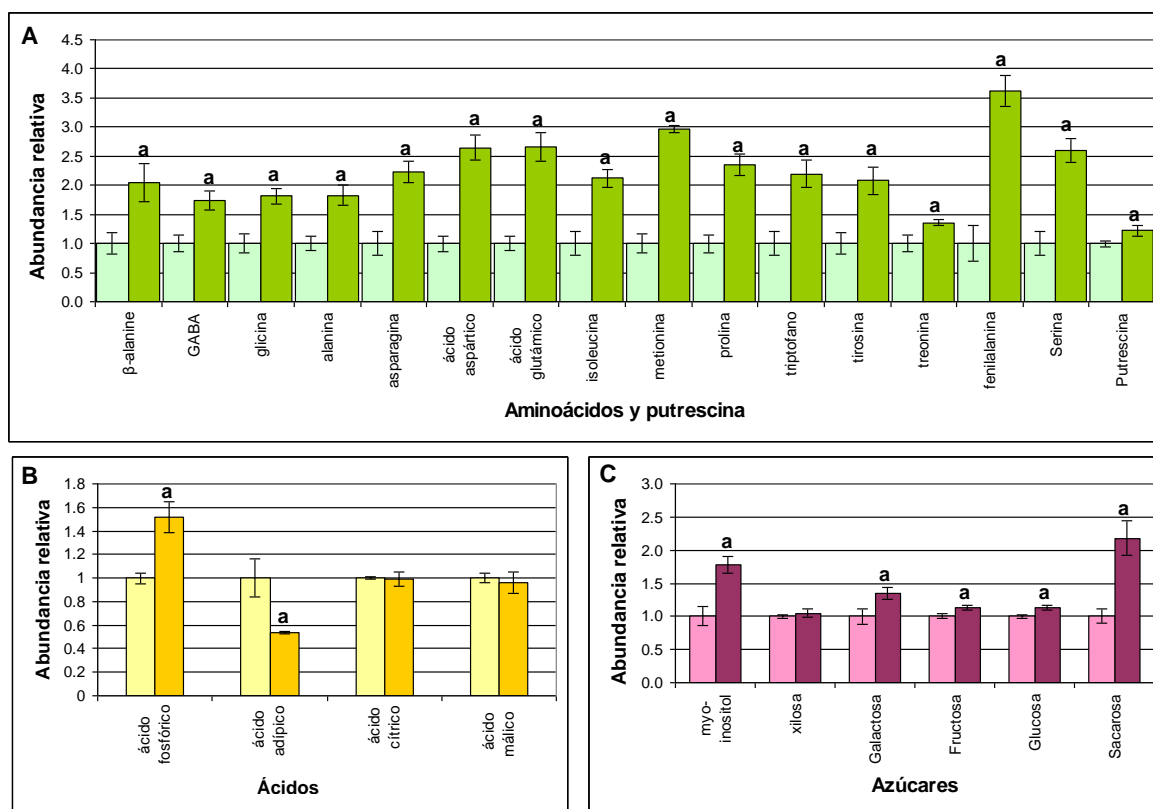


Figura 54. Valores relativos de los metabolitos primarios analizados en los frutos del genotipo MMK 59.1 respecto al genotipo silvestre. (A) Abundancia de aminoácidos y putrescina (barras de color verde). (B) Abundancia de ácidos (barras de color amarillo). (C) Abundancia de azúcares (barras de color rosa). Los datos se han normalizado respecto a la abundancia media calculada para el genotipo silvestre. Cada barra representa la media \pm el error estándar de las cinco réplicas biológicas realizadas con cada genotipo. La letra "a" indica diferencias significativas para $p < 0,05$ del genotipo MMK TR 59.1 (color oscuro) respecto al silvestre (color claro).

El análisis de los metabolitos primarios reveló que los niveles de todos los aminoácidos evaluados se encuentran significativamente incrementados en los frutos del genotipo transgénico MMK TR 59.1 al compararlos con los de los frutos del genotipo silvestre (Figura 54A). Respecto al contenido en ácidos, cabe mencionar que el nivel de ácido fosfórico se incrementó en los frutos del genotipo transgénico MMK TR 59.1 respecto al de los frutos del genotipo silvestre mientras que, el nivel de ácido adípico se redujo en los frutos del genotipo transgénico. Los niveles de ácido cítrico y ácido málico fueron similares en los frutos de ambos genotipos (Figura 54B). Todos los azúcares (a excepción de la xilosa) aumentaron significativamente en los frutos del genotipo transgénico MMK TR 59.1, en comparación con los mostrados por los frutos del genotipo silvestre (Figura 54C).

El aumento del contenido en aminoácidos es de gran importancia puesto que, por un lado mejoran el valor nutritivo y protéico de los frutos y, por otro lado, contribuyen a realzar el sabor de los frutos proporcionando un efecto tampón (Bucheli *et al.*, 1999). En lo que respecta al contenido en ácidos, es difícil determinar el efecto que pueden provocar los cambios observados en el genotipo transgénico, ya que, los niveles de los mismos no varían en el mismo sentido. El incremento producido en el contenido en azúcares en este genotipo indica que estos frutos tienen un mayor grado de dulzor y, en consecuencia estos frutos tendrían una mayor aceptación por el consumidor (Malundo *et al.*, 1995).

6. Análisis transcriptómico del desarrollo temprano del ovario de plantas transgénicas de tomate *PsEND1::barnasa*

Con objeto de identificar cambios globales a nivel de transcripción en los ovarios transgénicos asociados al fenotipo de partenocarpia obtenido en los frutos de plantas transgénicas, se ha llevado a cabo un análisis transcripcional utilizando la micromatriz de oligonucleótidos TOM2 (8.2. Materiales y Métodos).

6.1. Diseño experimental y obtención del material vegetal

Se recogieron ovarios de plantas silvestres y de plantas *PsEND1::barnasa* en 5 estadios de desarrollo, comprendidos entre 5-7 días antes de antesis y 1-4 días después de la antesis (1.4 Materiales y Métodos). Se extrajo RNA de todos los ovarios, se amplificó mediante síntesis de cDNA y se transcribió *in vitro*. Para el experimento se utilizó una muestra de referencia consistente en la mezcla equimolar de RNA amplificado de todas las muestras individuales, silvestres y *PsEND1::barnasa* correspondientes a todos los estadios de desarrollo.

Cada muestra individual se comparó con la mezcla de referencia hibridándolas juntas en una misma micromatriz. De cada hibridación se realizaron tres réplicas técnicas, lo que supuso un total de 30 micromatrices.

Posteriormente se llevó a cabo el pre-procesado de los datos de las hibridaciones para eliminar aquellos puntos que no superasen los criterios de calidad descritos en 8.6.1. Materiales y Métodos. Para cada punto seleccionado se aplicó un filtro de superación de los criterios en al menos 21 de las 30 hibridaciones (70% del total).

Con los puntos que superaban todos los controles de calidad citados se realizó una búsqueda de genes con expresión diferencial en el genotipo transgénico respecto al silvestre, para cada uno de los estadios de desarrollo estudiados. Para ellos se aplicó el análisis estadístico SAM (Significance Analysis of Microarrays) “two class unpaired”, con una tasa de falsos positivos, FDR (False Discovery Rate) del 0,05%. Finalmente, se seleccionaron aquellos genes cuyos niveles de expresión en ovarios transgénicos respecto a sus controles correspondientes difería en, al menos, 1,5 veces, es decir, presentaban un nivel igual o superior a 0,585 ó igual o inferior a $-0,585$ cuando los cocientes de intensidad se expresan en unidades logarítmicas $|(\log_2 \text{Cy3/Cy5})| \geq 0,585$. De este modo, para cada uno de los estadios de desarrollo estudiados obtuvimos listas de genes que presentaron diferencias significativas entre los ovarios *PsEND1::barnasa* y los silvestres (Anexo III).

6.2. Anotación funcional de la micromatriz TOM2

La micromatriz TOM2, de oligonucleótidos largos de tomate, fue desarrollada por un Consorcio Internacional y su descripción se encuentra disponible en el Anexo IV y en Tomato Functional Genomic Database (<http://ted.bti.cornell.edu>). Esta micromatriz contiene 12.160 oligonucleótidos de los cuales 300 son controles y 11.862 representan unigenes (aproximadamente el 30% de la totalidad del genoma del tomate, ya que se ha estimado que el genoma está constituido por 40.000 genes (Mueller *et al.*, 2009)).

En el presente trabajo se ha utilizado el programa informático Mapman (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>) para llevar a cabo la clasificación de los genes de TOM2 en categorías funcionales (Usadel *et al.*, 2005). Además, este programa ofrece la posibilidad de representar los resultados obtenidos con micromatrices en diagramas que muestran las rutas o procesos metabólicos, permitiendo visualizar la expresión génica en un contexto biológico. En el programa Mapman la ontología génica es jerárquica y se basa en agrupaciones denominadas "BIN". Cada BIN engloba los términos que hacen referencia a funciones biológicas similares pudiéndose dividir en subBINs (que corresponden a categorías funcionales englobadas dentro de ella).

En la Tabla 26 se muestra un resumen de la anotación funcional, el número total y el porcentaje de unigenes correspondiente a cada categoría funcional que se encuentran representados en TOM2. Las categorías que presentaron mayor número de unigenes fueron las relacionadas con mecanismos de "Regulación" (32,09%). En este grupo destacan categorías funcionales como "Regulación de la actividad de proteínas" (10,44%), "Regulación de la transcripción" (9,75%) y "Señalización" (6,42%). Los procesos relacionados con "Metabolismo" representan el 25,86% de los unigenes contenidos en la micromatriz TOM2; en esta categoría destacan "Otros procesos relacionados con el metabolismo" (8,64%). También presentan un elevado número de unigenes con expresión diferencial las categorías funcionales "Estrés" (3,42%), "Síntesis y plegamiento de proteínas" (3,33%) y "Célula" (3,16%). Estas tres categorías se encuentran englobadas en el grupo denominado "Otros" (15,32%). También encontramos un elevado porcentaje de unigenes englobados en "Desconocidos" (24,92%).

Tabla 26. Clasificación funcional de los unigenes representados en la micromatriz TOM2 según el programa Mapman (Thimm *et al*, 2004). Los unigenes están clasificados en BINs; ^a BINs relacionados con el metabolismo global: metabolismo primario de carbohidratos (BIN2), metabolismo secundario de carbohidratos (BIN3), glicólisis (BIN4), fermentación (BIN5), gluconeogénesis/ciclo del carboxilato (BIN6), ruta de las pentosas fosfato (BIN7), ciclo de los ácidos tricarbónicos (BIN8) y transporte electrónico mitocondrial/síntesis de ATP (BIN9). ^b Otros procesos relacionados con el metabolismo: asimilación de nitrógeno (BIN12), asimilación de azufre (BIN14), utilización de metales (BIN15), síntesis de cofactores y vitaminas (BIN18), síntesis de tetrapirroles (BIN19), metabolismo de nucleótidos (BIN23), biodegradación de xenobióticos (BIN24), metabolismo C-1(BIN25) y enzimas misceláneas (BIN26). ^c Procesos relacionados con la regulación de la actividad de proteínas: señalización de proteínas (BIN 29.3), modificación postraduccional de proteínas (BIN 29.4), degradación de proteínas (BIN 29.5), plegamiento de proteínas (BIN 29.6), glicosilación de proteínas (BIN 29.7) y ensamblaje de proteínas (BIN 29.8).

CATEGORIAS FUNCIONALES	UNIGENES	
	Nº	%
METABOLISMO		
Fotosíntesis (BIN1)	174	1,47
Metabolismo global ^a	429	3,62
Metabolismo de lípidos (BIN11)	240	2,02
Metabolismo de aminoácidos (BIN13)	227	1,91
Metabolismo secundario(BIN16)	292	2,46
Transporte (BIN34)	439	3,70
Pared celular (BIN10)	242	2,04
Otros procesos relacionados con metabolismo ^b	1,025	8,64
Total metabolismo	3,068	25,86
REGULACIÓN		
Hormonas (BIN17)	335	2,82
Metabolismo de poliaminas (BIN22)	28	0,24
Regulación redox (BIN21)	152	1,28
Regulación de la transcripción (27.3)	1,157	9,75
Estructura de la cromatina (BIN28.1)	136	1,15
Regulación de la actividad de proteínas ^c	1,238	10,44
Señalización (BIN30)	761	6,42
Total regulación	3,807	32,09
OTROS		
Procesado y transcripción RNA (BIN 27.1, 27.2 Y 27.4)	250	2,11
Reparación y síntesis DNA (BIN28.2 Y 28.3)	62	0,52
Síntesis y plegamiento de proteínas (BIN 29.1 Y 29.2)	395	3,33
Estrés (BIN20)	406	3,42
Desarrollo (BIN33)	329	2,77
Célula (BIN31)	375	3,16
Total otros	1,817	15,32
Desconocidos (BIN35)	3,170	24,92

6.3. Estudio del transcriptoma de los ovarios *PsEND1::barnasa* en diferentes estadios de desarrollo

6.3.1. Identificación y análisis de los genes expresados diferencialmente

Para identificar los genes expresados diferencialmente en los ovarios de plantas *PsEND1::barnasa* respecto a los ovarios silvestres se realizó el análisis SAM en el que se comparó la expresión génica en los ovarios transgénicos y silvestres en cada uno de los estadios de desarrollo estudiados. Los resultados mostraron que la mayor actividad transcripcional se encuentra en los estadios 4 y 1, ya que en estos estadios hay un gran número de genes inducidos y reprimidos. Los estadios 5, 2, y 3 presentaron menor número de genes diferencialmente expresados (Figura 55).

Estos resultados indican que el desarrollo del ovario *PsEND1::barnasa* es un proceso dinámico en el que se encuentran implicados un gran número de genes.

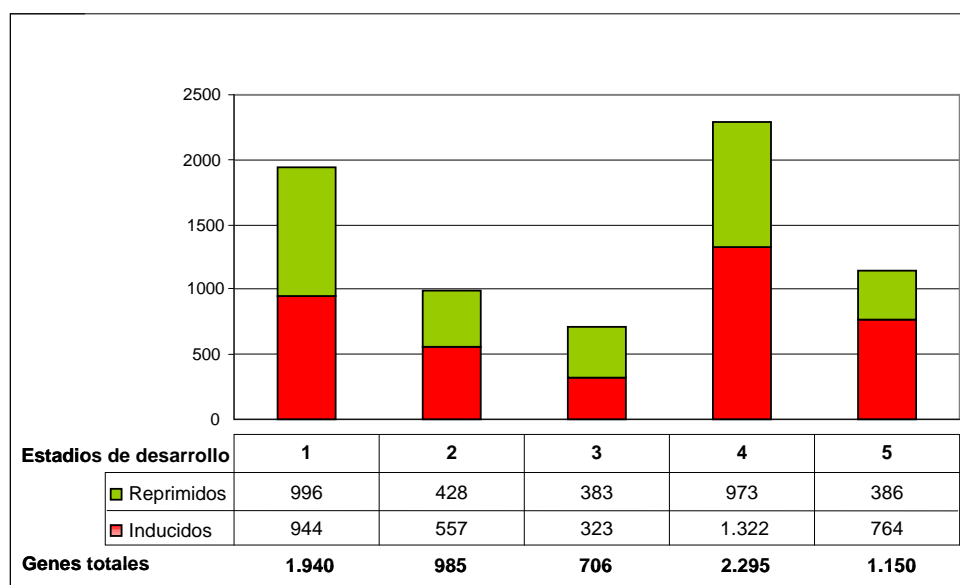


Figura 55. Cambios generales de expresión en ovarios transgénicos *PsEND1::barnasa* respecto a los ovarios silvestres durante los 5 estadios de desarrollo estudiados. Las barras representan el número total de genes expresados diferencialmente, en color verde se representan los genes reprimidos y en color rojo los genes inducidos.

En el estadio 1 se han identificado 1.940 genes diferencialmente expresados (16,35% del total de unigenes de la micromatriz TOM2); de éstos, 944 (48,66%) se encuentran inducidos y 996 (51,34%) reprimidos. En el estadio 2 se identificaron 985 genes regulados diferencialmente (8,30% del total de unigenes de la micromatriz TOM2), de los cuales 557 (56,55%) están inducidos y 428 (43,45%) reprimidos. En el estadio 3 de desarrollo 706 genes (5,95% del total de unigenes de la micromatriz TOM2); en estos

tres estadios, aproximadamente la mitad de los genes están inducidos y la otra mitad están reprimidos. En el estadio 4, 2.295 genes (19,35% del total de unigenes de la micromatriz TOM2) se expresaron diferencialmente; de ellos, 1.322 (57,60%) se muestran inducidos y 973 (42,39%) reprimidos. En el estadio 5, 1.150 genes (9,69% del total de unigenes de la micromatriz TOM2) se expresaron diferencialmente; la mayoría de ellos, 764 (66,43%) inducidos y el resto, 386 (33,56%) reprimidos. Estos datos indican que, a pesar de haber un importante número de genes regulados en los 5 estadios, en los tres primeros la proporción de genes inducidos-reprimidos fue del 50% mientras que en los estadios 4 y 5 el número de genes inducidos es mayor que el de reprimidos (57,60% y 66,43%, respectivamente).

Con objeto de identificar genes específicos de cada estadio de desarrollo se han utilizado diagramas de Venn. Este tipo de diagramas permite entender las relaciones entre conjuntos, representando grupos de ítems o ideas que comparten o no determinadas propiedades. Al superponer dos o más figuras geométricas, las áreas que confluyen indican la existencia de subconjuntos que tienen elementos comunes a ellas. En las áreas restantes, propias de cada figura, se ubican los elementos pertenecientes únicamente a éstas, siendo, por tanto, elementos específicos de las mismas. El diagrama de Venn clásico utilizaba 2 ó 3 círculos pero, cuando queremos comparar más conjuntos, tenemos que ir aumentando el número de círculos. El problema es que no podemos trazar un diagrama con cuatro o más círculos, cada uno de los cuales se solape parcialmente con cada uno de los otros, es matemáticamente imposible. Por este motivo, para comparar los 5 estadios de desarrollo hemos utilizado los triángulos como figuras geométricas; cada triángulo representa un estadio de desarrollo (Figura 56).

En el estadio 1 observamos el mayor número de unigenes que se inducen específicamente, concretamente 579 unigenes (61,33% del total de unigenes inducidos en dicho estadio). En lo que respecta a la represión, 602 unigenes se reprimen de manera específica en este momento del desarrollo (60,44% del total de genes reprimidos). Las categorías que engloban el mayor número de unigenes específicos inducidos son, en primer lugar, “síntesis y plegamiento de proteínas” (13,64%) seguida de “regulación de la actividad de proteínas” (8,80%) y “regulación de la transcripción” (7,77%). En la primera destacan unigenes que codifican proteínas ribosomales (al menos 33 pertenecientes a la subunidad ribosomal 60s y 22 pertenecientes a la subunidad 40s); en la segunda destacan factores de iniciación, elongación y terminación de la transcripción así como proteínas F-box y ubiquitinas. Por último, en “regulación de la transcripción” encontramos representantes de las familias de factores de transcripción AP2/EREBP, bHLH, AUX/IAA, ARF, MADS-box,

MYB, y Zinc-Finger. Las categorías que engloban el mayor número de unigenes específicos reprimidos son, en primer lugar “regulación de la transcripción” (13,29%) y, en segundo lugar, “regulación de la actividad de proteínas” (10,13%). En la primera destacan un elevado número de representantes de las familias de factores de transcripción bHLH, AP2/EREBP, AUX/IAA, ARF, MADS-box, MYB, WRKY, bZIP y Zinc-Finger. La familia más abundante de factores de transcripción corresponde al tipo bHLH, que presentó el triple de unigenes con expresión diferencial que el resto de familias mencionadas. En la segunda, destacan, a partes iguales, unigenes relacionados con la modificación y degradación de proteínas.

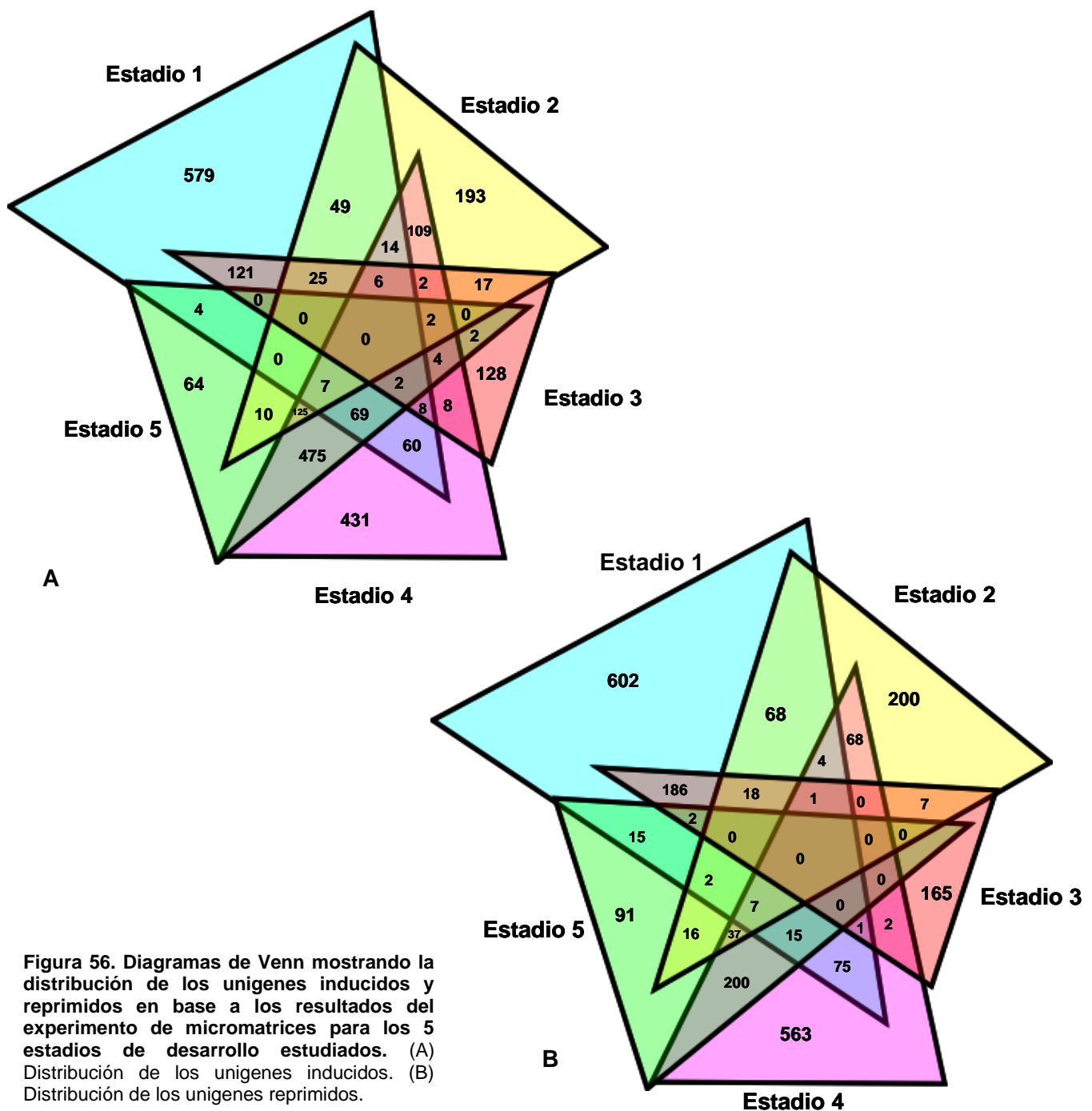


Figura 56. Diagramas de Venn mostrando la distribución de los unigenes inducidos y reprimidos en base a los resultados del experimento de micromatrices para los 5 estadios de desarrollo estudiados. (A) Distribución de los unigenes inducidos. (B) Distribución de los unigenes reprimidos.

En el estadio 4 observamos también un elevado número de unigenes que se inducen específicamente, concretamente 431 unigenes (32,60% del total de unigenes inducidos en dicho estadio). En lo que respecta a la represión, 563 unigenes se reprimen de manera específica en este momento del desarrollo (57,86% del total de genes reprimidos). El mayor porcentaje de los unigenes específicos inducidos pertenecen a la categoría funcional “regulación de la transcripción” (18,33%), seguido por el porcentaje que representan los unigenes pertenecientes a “regulación de la actividad de proteínas” (16,24%). En la primera destacan miembros de la mayoría de las familias que aparecían inducidas en el estadio 1, con excepción de la familia AP2/EREBP y además encontramos representantes de las familias, TCP, HB y bZIP. En la segunda destacan unigenes relacionados con la modificación de proteínas y, sobretudo con la degradación de las mismas. Entre los genes reprimidos el grupo más numeroso está formado por unigenes relacionados con “regulación de la transcripción” (21,58%) seguido por “regulación de la actividad de proteínas” (16,87%). En el primer grupo destacan las familias HB, Zinc Finger (C2H2), MADS y MYB. En el segundo grupo el mayor número de unigenes corresponden al proceso de degradación de proteínas, destacando las ubiquitinas.

En los estadios 2, 3 y 5 se han obtenido, respectivamente, 193, 128 y 64 unigenes específicos inducidos y 200, 165 y 91 unigenes específicos reprimidos.

Estas comparaciones nos han permitido conocer la existencia de varios grupos de unigenes comunes a los diferentes estadios de desarrollo. No hemos encontrado unigenes en común a los cinco estadios de desarrollo estudiados que se induzcan o repriman. Entre los grupos que muestran unigenes comunes a dos o más estadios, el más numeroso fue el formado por unigenes compartidos entre el estadio 4 y 5 del desarrollo. Concretamente, 475 unigenes están inducidos en ambos estadios y 200 unigenes están reprimidos en ambos estadios.

6.3.2. Clasificación funcional de los unigenes

Para hacer una interpretación biológica de los resultados, es necesario llevar a cabo una anotación funcional de los unigenes. Así pues, tal y como se ha descrito para la micromatriz TOM2 de forma conjunta (6.2. Resultados), obtuvimos, para los unigenes que se mostraron expresados diferencialmente en cada uno de los estadios de desarrollo, su anotación funcional según el programa Mapman. En la Tabla 27 se muestra un resumen del número de unigenes expresados diferencialmente que corresponden a cada categoría funcional así como los porcentajes que representan dichos unigenes respecto al número total de los genes que cada categoría tiene en la

micromatriz TOM2. La clasificación funcional de los unigenes expresados diferencialmente indicó que las categorías funcionales más abundantes varían en función del estadio de desarrollo. En el estadio 1 y 4 de desarrollo destacan las categorías funcionales relacionadas con el Metabolismo, con un 20,18% y 23,92%, respectivamente. Concretamente, la categoría que presentó mayor número de unigenes fue “Fotosíntesis” (29,89% y 39,66%), “Metabolismo de aminoácidos” (25,11% y 28,63%) y “Pared celular” (23,97% y 28,51%). Además, en ambos estadios también encontramos categorías funcionales relacionadas con los mecanismos de regulación con un gran número de unigenes expresados diferencialmente. En concreto destaca el “Metabolismo de poliaminas” (57,14% en el estadio 1 y 46,43% en el estadio 4) y “Hormonas” (24,48% en el estadio 1 y 24,78% en el estadio 4). Otras categorías funcionales que también presentan un elevado número de unigenes diferencialmente expresados fueron, para el estadio 1, “Síntesis y plegamiento de proteínas” (28,61%) y “Desarrollo” (24,01%). En el estadio 4 también destaca la categoría de “Desarrollo” (27,05%) y “Estrés” (22,41%).

En los estadios 2, 3 y 5 hay menor número de unigenes expresados diferencialmente en las distintas categorías funcionales. En el estadio 2 las categorías más representadas fueron: “Desarrollo” (18,24%), “Metabolismo de poliaminas” (17,86%) y “Hormonas” (15,52%). En el estadio 3 y 5 la categoría que mostró mayor número de genes con expresión diferencial fue “Fotosíntesis” con 27,01% y 32,76%, respectivamente. Además, en el estadio 5, también cabe destacar el “Metabolismo de poliaminas”, con un 32,14%.

Tabla 27. Clasificación funcional de los unigenes expresados diferencialmente en los ovarios transgénicos para los cinco estadios de desarrollo estudiados según el programa Mapman (Thimm *et al*, 2004). Se representa el número total de unigenes expresados diferencialmente pertenecientes a cada categoría funcional así como el porcentaje que representan estos unigenes sobre el total de unigenes de la micromatriz TOM2. Los unigenes están clasificados en BINs; ^a BINs relacionados con el metabolismo global: metabolismo primario de carbohidratos (BIN2), metabolismo secundario de carbohidratos (BIN3), glicólisis (BIN4), fermentación (BIN5), gluconeogénesis/ciclo del carboxilato (BIN6), ruta de las pentosas fosfato (BIN7), ciclo de los ácidos tricarbóxicos (BIN8) y transporte electrónico mitocondrial/síntesis de ATP (BIN9). ^b Otros BINS relacionados con el metabolismo: asimilación de nitrógeno (BIN12), asimilación de azufre (BIN14), utilización de metales (BIN15), síntesis de cofactores y vitaminas (BIN18), síntesis de tetrapirroles (BIN19), metabolismo de nucleótidos (BIN23), biodegradación de xenobióticos (BIN24), metabolismo C-1(BIN25) y enzimas misceláneas (BIN26). ^c BINS relacionados con la regulación de la actividad de proteínas: señalización de proteínas (BIN 29.3), modificación postraduccional de proteínas (BIN 29.4), degradación de proteínas (BIN 29.5), plegamiento de proteínas (BIN 29.6), glicosilación de proteínas (BIN 29.7) y ensamblaje de proteínas (BIN 29.8).

CATEGORIAS FUNCIONALES	UNIGENES EN LOS ESTADIOS										
	1		2		3		4		5		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
METABOLISMO											
Fotosíntesis (BIN1)	52	29,89	22	12,64	47	27,01	69	39,66	57	32,76	
Metabolismo global ^a	71	16,55	37	8,62	20	4,66	80	18,65	37	8,62	
Metabolismo de lípidos (BIN11)	41	17,08	16	6,67	15	6,25	57	23,75	32	13,33	
Metabolismo de aminoácidos (BIN13)	57	25,11	26	11,45	13	5,73	65	28,63	29	12,78	
Metabolismo secundario(BIN16)	64	21,92	31	10,62	19	6,51	71	24,32	38	13,01	
Transporte (BIN34)	89	20,27	42	9,57	31	7,06	105	23,92	50	11,39	
Pared celular (BIN10)	58	23,97	26	10,74	28	11,57	69	28,51	48	19,83	
Otros procesos relacionados con metabolismo ^b	187	18,06	103	10,51	98	10,00	218	21,27	143	14,59	
Total metabolismo	619	20,18	303	9,88	271	8,83	734	23,92	434	14,15	
REGULACIÓN											
Hormonas (BIN17)	82	24,48	52	15,52	37	11,04	83	24,78	58	17,31	
Metabolismo de poliaminas (BIN22)	16	57,14	5	17,86	3	10,71	13	46,43	9	32,14	
Regulación redox (BIN21)	24	15,79	8	5,26	11	7,24	35	23,03	15	9,87	
Regulación de la transcripción (27.3)	173	14,95	98	8,47	50	4,32	231	19,97	99	8,56	
Estructura de la cromatina (BIN28.1)	15	11,03	7	5,15	15	11,03	30	22,06	22	16,18	
Regulación de la actividad de proteínas ^c	168	13,49	90	7,69	47	4,01	217	17,53	78	6,66	
Señalización (BIN30)	96	12,61	57	7,49	36	4,73	129	16,95	56	7,36	
Total regulación	574	15,08	317	8,33	199	5,23	738	19,39	337	8,85	
OTROS											
Procesado y transcripción RNA (BIN 27.1, 27.2 Y 27.4)	31	11,36	14	7,95	7	3,98	38	15,20	12	6,82	
Reparación y síntesis DNA (BIN28.2 Y 28.3)	5	9,41	5	2,94	2	1,18	9	14,52	3	1,76	
Síntesis y plegamiento de proteínas (BIN 29.1 Y 29.2)	113	28,61	36	9,11	33	8,35	67	16,96	25	6,33	
Estrés (BIN20)	82	20,20	33	8,13	31	7,64	91	22,41	60	14,78	
Desarrollo (BIN33)	79	24,01	60	18,24	31	9,42	89	27,05	39	11,85	
Célula (BIN31)	39	10,40	16	4,27	8	2,13	54	14,40	25	6,67	
Total otros	349	19,21	164	9,03	112	6,16	475	16,07	164	9,03	
Desconocidos (BIN35)	398	13,46	201	6,34	124	3,91	823	26	215	6,78	

6.3.3. Visualización de los cambios transcripcionales mediante el programa Mapman

El programa Mapman permite la ilustración de los resultados obtenidos en el análisis de micromatrices mediante diagramas y rutas metabólicas que facilitan la detección de cambios en los niveles transcripcionales de los genes (Thimm *et al.*, 2004). Todos los genes que mostraron cambios significativos se representan en los siguientes diagramas; en color rojo se encuentran los genes inducidos (cuanto mayor es el valor de inducción más intenso es el color rojo que se adquiere) y en color verde los genes reprimidos (cuanto mayor es el valor de represión más intenso es el color verde que se adquiere). En nuestro análisis, el mayor número de cambios transcripcionales entre los ovarios silvestres y *PsEND1::barnasa* se han observado en los estadios de desarrollo 1 y 4; por este motivo, a continuación se exponen los resultados correspondientes a estos dos estadios. Los resultados obtenidos para los restantes estadios estudiados se encuentran en el Anexo V. En la Figura 57 se representan los cambios transcripcionales que hacen referencia al metabolismo, producidos en los ovarios de plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* respecto a los silvestres. En el panel (A) se han representado los cambios correspondientes al estadio 1 de desarrollo. En el panel (B) se han representado los cambios que tienen lugar en el estadio 4 de desarrollo.

Los principales cambios transcripcionales a nivel de metabolismo están asociados con la fotosíntesis, el metabolismo de azúcares, la biosíntesis y modificación de la pared celular, el metabolismo de lípidos, metabolismo de aminoácidos y con el metabolismo secundario. Cabe destacar que, en el estadio 4, aproximadamente el 90% de estos cambios corresponden a unigenes que presentan inducción moderada o fuerte.

En la Figura 58 se representan los cambios transcripcionales que tienen lugar en los ovarios *PsEND1::barnasa* respecto a los ovarios silvestres, referentes a los mecanismos de regulación. En el panel (A) se muestran los cambios transcripcionales correspondientes al estadio 1 de desarrollo mientras que en el panel (B) se representan los cambios transcripcionales que corresponden al estadio 4.

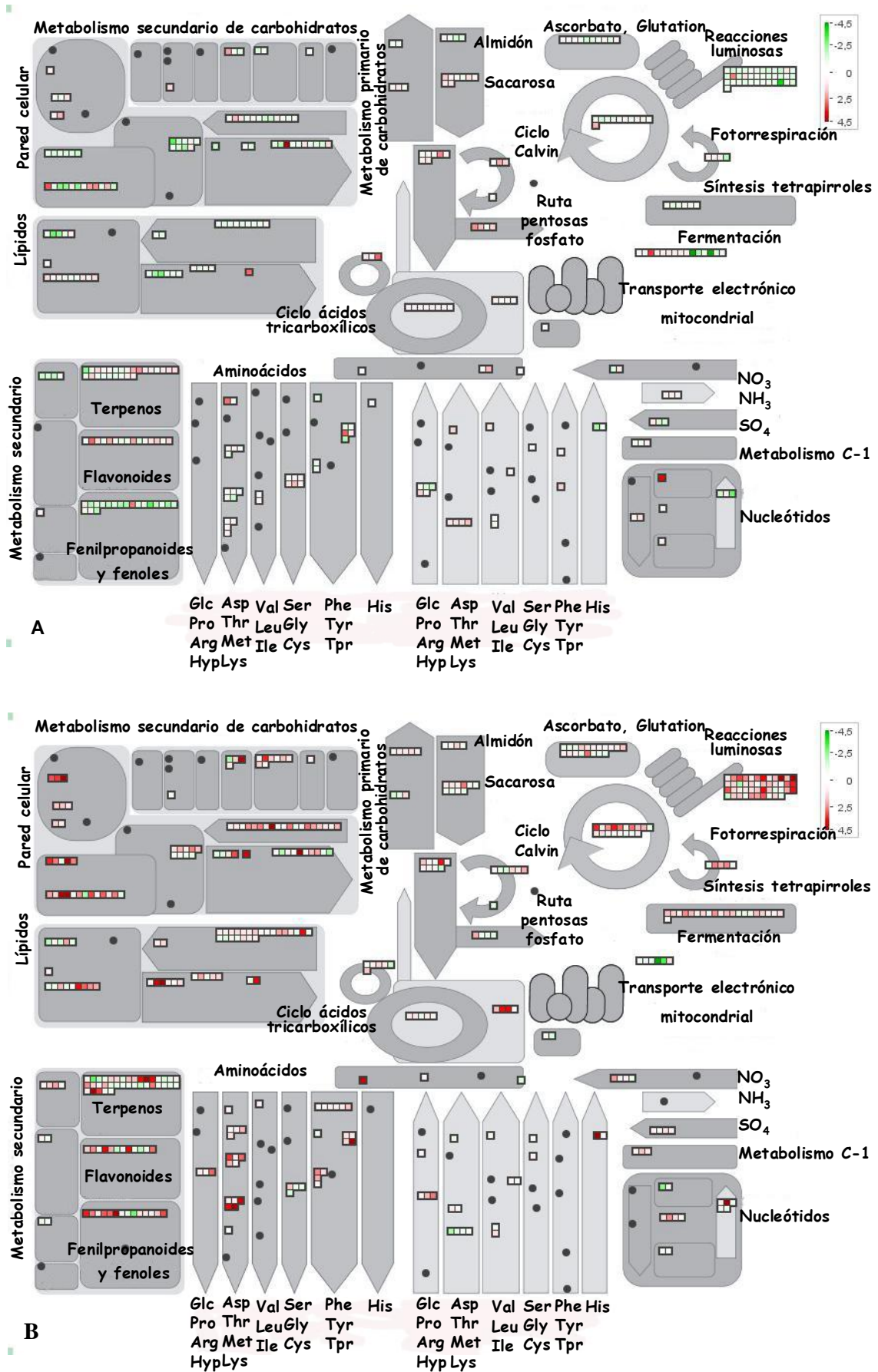


Figura 57. Visualización, mediante el programa Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos asociados con el metabolismo de los ovarios *PsEND1::barnasa* comparándolos con los ovarios silvestres. (A) En el estadio 1. (B) En el estadio 4 de desarrollo.

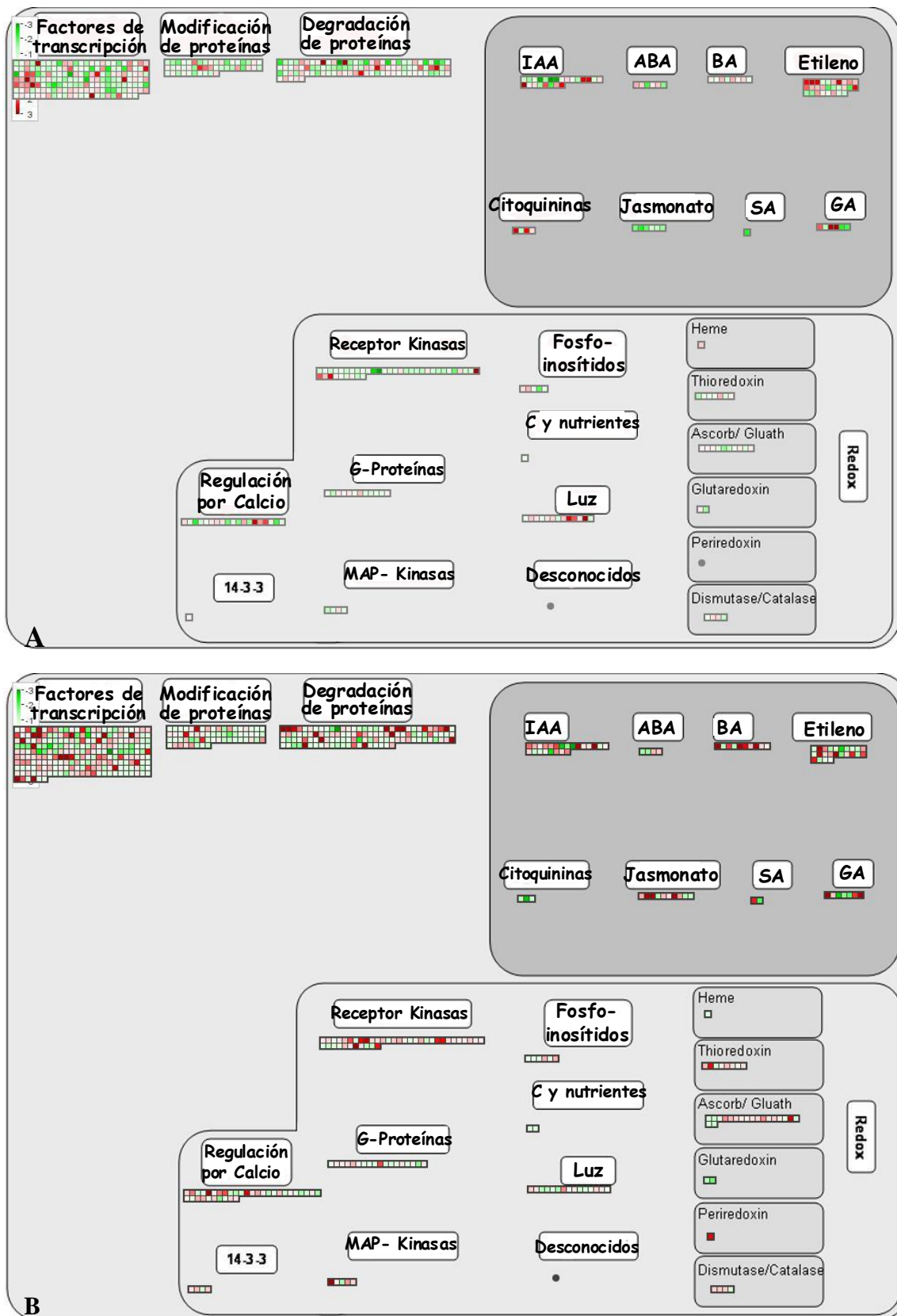


Figura 58. Visualización, mediante el programa Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos asociados con los mecanismos de regulación de los ovarios *PsEND1::barnasa* comparándolos con los ovarios silvestres. (A) En el estadio 1 de desarrollo. (B) En el estadio 4 de desarrollo.

METABOLISMO

Fotosíntesis y el metabolismo de azúcares

Estadio 1

En general, los unigenes relacionados con la fotosíntesis (reacciones luminosas y ciclo de Calvin) presentaron represión global. Entre los primeros destacaron los unigenes que codifican proteínas de unión a clorofila a y b (CAB4, CAB2B y CAB), que participan en la maximización y regulación de la captación de luz en los fotosistemas y unigenes que codifican proteínas relacionadas con el fotosistema I (PSI), fotosistema II (PSII) y ATP sintasa. Entre los segundos encontramos unigenes con homología a otros que codifican proteínas de la subunidad 1A y 3B de la RuBisCo así como con homología a proteínas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPB) de *Nicotiana tabacum*.

Respecto al metabolismo de los azúcares, en nuestro análisis, han mostrado expresión diferencial determinados unigenes involucrados en la síntesis-degradación de la sacarosa y del almidón. El 80% de los unigenes representados en la micromatriz que han mostrado expresión diferencial y están implicados en el metabolismo de la sacarosa se encuentran inducidos. Entre ellos encontramos 6 unigenes que codifican enzimas sacarosa invertasas, implicadas en el catabolismo de la sacarosa. Se ha descrito que estas enzimas participan junto con otras, en la degradación de la sacarosa y que, los niveles de relativos de sacarosa en el fruto varían principalmente como consecuencia de su actividad (Wang *et al.*, 2009). El 83% de los unigenes implicados en el metabolismo del almidón están reprimidos; destacó un unigen con elevada similitud de secuencia con una glucano fosforilasa de *Solanum tuberosum*.

Estadio 4

En general, los unigenes relacionados con la fotosíntesis (reacciones luminosas y con ciclo de Calvin) presentaron inducción global. Entre los primeros destacan las proteínas de unión a clorofilas CAB1-B y CAB13, que estaban fuertemente inducidas.

Las proteínas de unión a clorofila (CAB2B, CAB4 y CAB), las relacionadas con los dos fotosistemas y las ATP sintasas, que en el estadio 1 estaban reprimidas, en este estadio aparecieron inducidas. Así mismo, proteínas de la subunidad 1A y 3B de la RuBisCo y otras con homología a una proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPB) de *Nicotiana tabacum* también presentaron inducción.

Respecto al metabolismo de azúcares el 50% de los unigenes implicados en el metabolismo de la sacarosa estaban inducidos mientras que, aproximadamente el

78% de los unigenes implicados en el metabolismo del almidón, se encontraron inducidos. En nuestro análisis destacó un unigen fuertemente inducido que presentó homología con una sacarosa invertasa de *Arabidopsis thaliana*.

Biosíntesis y modificación de la pared celular

La pared celular vegetal es una entidad compleja, diversa y dinámica, puesto que cambia durante los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular. Durante el periodo de maduración del fruto tienen lugar la expresión de una serie de enzimas encargadas de los procesos de degradación de la pared celular. Enzimas como la pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa (Seymour *et al.*, 1987; Seymour *et al.*, 1990) son responsables de la degradación parcial de polisacáridos como pectinas, hemicelulosas y celulosa, los cuales son constituyentes principales de la pared celular del fruto de tomate (Reinders y Thier, 1999).

En nuestro caso, la mayoría de unigenes expresados diferencialmente están relacionados con la biosíntesis y modificación de la pared celular. Entre ellos destacaron unigenes que codifican enzimas hidrolíticas de la pared celular (celulosa sintasas, extensinas, poligalacturonasas (PG), glucanasas y pectinmetilesterasas (PME)).

Estadio 1

Se han identificado 58 unigenes relacionados con enzimas hidrolíticas de los cuales el 36% mostraron inducción y el 64% represión. Entre ellos observamos 4 unigenes que codifican expansinas, dos de ellas inducidas y otras dos reprimidas. Diversos autores han descrito que las expansinas están involucradas en el crecimiento celular y en la maduración del fruto. Éstas actúan sobre los componentes de la pared celular vegetal rompiendo los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas de polisacáridos con lo que producen una relajación de la estructura de la pared (Cosgrove, 2000). Esta relajación permite la incorporación de subunidades a los polímeros produciéndose la extensión de la pared.

También encontramos expresado diferencialmente un unigen homólogo a una poligalacturonasa de *Arabidopsis thaliana* fuertemente inducida y dos inhibidores de poligalacturonasa PGIP1 (inducido) y PGIP2 (reprimido), implicados en el crecimiento del fruto. Se ha descrito que la actividad poligalacturonasa está asociada con cambios en las propiedades mecánicas de la pared celular confiriéndole un aumento de rigidez a la misma durante la maduración del fruto. Además, ensayos de compresión

realizados con muestras de frutos de tomate mostraron que existe una correlación positiva entre la actividad poligalaturonasa y la firmeza del fruto (Hobson, 1965).

Estadio 4

Se han identificado 69 unigenes relacionados con la pared celular; el 80% de ellos se encuentran inducidos. Este grupo de unigenes inducidos incluye enzimas hidrolíticas de la pared celular. Con una inducción muy fuerte destacaron dos unigenes que codifican enzimas xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa (XTH3) de tomate. Diversos autores han descrito que la actividad xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa muestra también una correlación con la tasa de crecimiento del fruto (Thompson *et al.*, 1998). Estas enzimas actúan orientando las fibras de xiloglucano, manteniendo la integridad de la pared celular. También encontramos fuertemente inducidos 3 unigenes que codifican pectinmetilesterasas de tomate. Las pectinmetilesterasas son enzimas que desempeñan un papel importante de ablandamiento del fruto durante la maduración. Eliminan los grupos metilo del ácido galacturónico de las pectinas aumentando la relajación de las capas de polisacáridos y la accesibilidad de otras enzimas como las poligalacturonasas (Koch y Nevins, 1989). De la misma manera que ocurría en el estadio 1, también destacan los inhibidores de poligalacturonasa (PGIP1 y PGIP2), pero, en este estadio, PGIP1 presentó una inducción 4 veces mayor que en el estadio 1 y, PGIP2 mostró también inducción.

Metabolismo de lípidos

Los unigenes relacionados con el metabolismo de lípidos que han mostrado expresión diferencial en ambos estadios de desarrollo están relacionados con la síntesis, desaturación y elongación de ácidos grasos, con el metabolismo de fosfolípidos, glicolípidos, esteroides y con la degradación de lípidos.

Estadio 1

El 68% de los unigenes relacionados con el metabolismo de lípidos están reprimidos. Entre ellos destacaron las enzimas desaturasas, que intervienen en la síntesis y desaturación de los ácidos grasos, siendo las responsables de la formación de dobles enlaces y del aumento del nivel de insaturación de los mismos. Diversos autores han descrito que la fluidez de la membrana depende del nivel de insaturación de los ácidos grasos, de manera que un aumento en la insaturación se traduce en la rigidez de la misma (Mikami y Murata, 2003). En nuestros resultados se han detectado dos

unigenes reprimidos codificantes de enzimas desaturasas: una desaturasa de omega 3 (FAD8) de tomate y un homólogo a una desaturasa omega 6 de *Borago officinalis*. En la degradación de los lípidos, los unigenes que se expresaron diferencialmente pueden clasificarse en dos grupos: unigenes que han mostrado homología con lipasas y unigenes con homología a fosfolipasas y lisofosfolipasas. Los 2 unigenes que mostraron una represión más fuerte fueron unigenes con homología a lipasas de *Arabidopsis thaliana*.

Estadio 4

El 75% de los unigenes relacionados con el metabolismo de lípidos están inducidos en este estadio. Entre los unigenes pertenecientes a este porcentaje destacan dos unigenes, fuertemente inducidos, involucrados en la degradación de lípidos que presentan homología con dos lipasas de *Arabidopsis thaliana*. Cabe mencionar que estos dos unigenes inducidos, en el estadio 1 estaban fuertemente reprimidos.

Metabolismo de aminoácidos

Con respecto al metabolismo de aminoácidos hemos observado cambios importantes a nivel de transcripción relacionados con la síntesis y degradación de aminoácidos.

Estadio 1

En este estadio hemos observado expresión diferencial de 55 unigenes involucrados en el metabolismo de aminoácidos. La mayoría de estos unigenes (63,63%) están implicados en los mecanismos de síntesis mientras que el 36,37% restante están involucrados en los procesos de degradación.

Además, el 65,7% de los unigenes implicados en la síntesis están inducidos; entre ellos encontramos, en primer lugar un unigen homólogo a la asparagina sintasa 1 (ASN1) de *Helianthus annuus*, implicada en la biosíntesis de asparagina. En segundo lugar, unigenes con homología a la triptófano sintasa de *Nicotiana tabacum* y fosforibosil-antranilato transferasa de *Arabidopsis thaliana*, ambas implicadas en la biosíntesis de triptófano. En tercer lugar, unigenes con homología a una serina-acil transferasa (SAT) *Nicotiana plumbaginifolia* implicada en la biosíntesis de la serina. Tanto el triptófano como la serina son aminoácidos que sirven como precursores de auxinas en plantas. Por último destacan unigenes con homología a la 2-isopropil-malato sintasa de *Solanum penelli* y a 3-isopropil-malato deshidrogenasa de *Brassica napus*, implicados en la ruta de biosíntesis de isoleucina

Entre los unigenes relacionados con la degradación de aminoácidos destaca una histidina descarboxilasa de *Solanum lycopersicum* implicado en la degradación de la histidina, que se encuentra reprimido.

Estadio 4

Un total de 62 unigenes involucrados en el metabolismo de aminoácidos han mostrado expresión diferencial. La mayoría de estos unigenes (66,13%) están implicados en los mecanismos de síntesis mientras que el 33,87% restante están involucrados en los procesos de degradación. El 80,40% de los unigenes implicados en la síntesis de aminoácidos están inducidos. En este porcentaje se incluyen, en primer lugar, 4 enzimas s-adenosil-metionina sintasas de tomate y un unigen homólogo a una triptófano sintasa de *Arabidopsis thaliana*, involucrados en la síntesis de metionina y triptófano, respectivamente. En segundo lugar, un unigen con homología a una ornitina descarboxilasa de *Glycine max* implicada en la síntesis de lisina. Por último, un unigen involucrado en la síntesis de GABA, homólogo a una GABA transaminasa de *Solanum lycopersicum*.

En lo que respecta a la degradación de aminoácidos destaca un unigen homólogo a una histidina descarboxilasa *Solanum lycopersicum*, fuertemente inducido, a diferencia de lo que ocurría en el estadio 1, en el que mostraba represión.

Metabolismo secundario

Respecto al metabolismo secundario se han encontrado cambios significativos en el metabolismo de terpenos, flavonoides y compuestos fenólicos.

En plantas, la biosíntesis de isoprenoides se produce mediante dos rutas independientes: la ruta citosólica clásica acetato/mevalonato (para la biosíntesis de esteroides y sesquiterpenos) y la vía alternativa 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (para biosíntesis de isoprenoides plastídicos tales como carotenoides, mono y diterpenos) (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). Ambas vías forman la unidad isopentildifosfato (IPP) como el precursor a partir del cual se forman otros isoprenoides vía adición cola-cabeza (Lichtenthaler *et al.*, 1997).

En el estadio 1 hemos observado 2 unigenes reprimidos y un unigen inducido que codifican enzimas 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasas. Estas enzimas catalizan la conversión de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato en metileritriol fosfato. Además, también hemos destacan dos unigenes con inducidos que codifican enzimas con homología a acetil-CoA C-acetiltransferasas de *Nicotiana tabacum*. Estos resultados parecen indicar que las dos rutas responsables de la síntesis de isoprenoides están

activadas. En el estadio 4, los unigenes que codifican enzimas 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasas que estaban reprimidas en el estadio 1 de desarrollo, siguen reprimidas. Además, aparece otro unigen reprimido que codifica otra enzima 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa. Análogamente a lo que ocurría que en el estadio 1, destacan dos unigenes fuertemente inducidos que presentan homología de secuencia con los que codifican acetil-CoA C-aciltransferasas de *Nicotiana tabacum*. En este estadio estos dos unigenes presentan inducción más fuerte que en estadio 1. Estos resultados indicarían que, en el estadio 4 de desarrollo se encuentra inducida la síntesis de terpenos vía la ruta clásica del acetato/mevalonato.

En las últimas etapas de la síntesis de terpenos intervienen enzimas ciclasas y sintetetasas, responsables de la conversión de geranyl pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) y geranylgeranylpirofosfato (GGPP) en unidades de isoprenilo que, posteriormente darán lugar a los terpenos. En el estadio 1, un total de dos unigenes, que mostraron represión, presentaron similitud de secuencia con enzimas geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS1) de *Capsicum annuum*. La enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa participa en la síntesis de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), precursor de diterpenos; actúa en los puntos en los que el metabolismo de isoprenoides se ramifica. Este hecho indica que puedan tener un papel clave en el control del flujo de IPP hacia la síntesis de diferentes familias de terpenoides (Lücker *et al.*, 2007).

El grupo de los terpenos incluye los pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas); éstos son los terpenos de mayor tamaño. En este trabajo también se ha identificado, en el estadio 1 de desarrollo, un grupo de unigenes inducidos homólogos a beta caroteno hidroxilasas de *Solanum lycopersicum*. Estas enzimas intervienen en la ruta de síntesis de carotenoides convirtiendo el beta caroteno en zeaxantina (Davison *et al.*, 2002).

La mayoría de los compuestos fenólicos de las plantas derivan de la fenilalanina, aminoácido esencial del metabolismo primario de las plantas y animales que interviene en el metabolismo secundario cuando la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la eliminación de un amonio convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico (Dixon *et al.*, 2002). Se ha descrito que esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y el secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos. En nuestros experimentos de micromatrices, en el estadio 1, hemos encontrado unigenes reprimidos que presentan una elevada similitud de secuencia con una fenilalanina amonio-liasa 1 (PAL1) de *Nicotiana tabacum*. En el estadio 4, han

presentado una inducción muy fuerte dos unigenes con similitud de secuencia a enzimas antranilato N-hidroxiciamonil/benciltransferasa de *Dianthus caryophyllus*.

Los flavonoides se pueden clasificar como chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, auronas, isoflavonas e isoflavanonas. Biosintéticamente provienen de un grupo común de flavonoides conocido como chalconas; éstas son sintetizadas por la enzima chalcona sintasa (CHS) a partir de una molécula de *p*-coumaril-CoA y 3 de malonil-CoA para formar naringenina chalcona (Ryder *et al.*, 1984; Ryder *et al.*, 1987; Cramer *et al.*, 1989; Hahlbrock y Scheel, 1989). Respecto a la biosíntesis de flavonoides, en el estadio 1, hemos visto expresado diferencialmente un unigen inducido que presentan homología con una chalcona sintasa de *Solanum tuberosum*.

En el estadio 4 dos unigenes presentaron una inducción fuerte, uno con homología a una isoflavona reductasa de *Solanum tuberosum* y otro con homología a una antocianidina-3-glucósido ramnosiltransferasa (*Petunia x hybrida*).

MECANISMOS DE REGULACIÓN

Los cambios transcripcionales de genes asociados a procesos de regulación han sido muy abundantes y corresponden principalmente a factores de transcripción y a cambios en la modificación y degradación de proteínas. También cabe destacar los cambios en la expresión de genes implicados en el metabolismo y respuesta a hormonas (auxinas, ácido abscísico, brasinoesteroides, etileno, citoquininas, ácido jasmónico, ácido salicílico y giberelinas).

Proteínas de unión a DNA

Entre las proteínas de unión a DNA hemos encontrado factores de transcripción; éstos controlan muchos aspectos del desarrollo de las plantas pues especifican dónde y cuándo se expresan un conjunto de genes. Dado que muchos factores de transcripción están regulados a nivel de transcripción, conocer dónde se expresan los genes que codifican factores de transcripción resulta de interés para comprender el papel biológico de los mismos (Czechowski *et al.*, 2004). La micromatriz TOM2 contiene 1.407 unigenes que codifican factores de transcripción, lo que supone un 12,08% del total de unigenes representados en ella.

Estadio 1

En el conjunto de unigenes expresados diferencialmente en los ovarios transgénicos en este estadio de desarrollo, se identificaron 173 unigenes que codifican factores de transcripción. El elevado número de factores de transcripción que mostraron expresión

pone de manifiesto la existencia de un complejo de regulación necesario para el desarrollo del fruto desde estadios muy tempranos del desarrollo del mismo.

En la Figura 59 se muestran las familias a las que pertenecen los factores de transcripción y otras proteínas de unión a DNA que se expresaron diferencialmente en el estadio de desarrollo más temprano estudiado. La familia más representada fue la constituida por bHLH. También se identificaron factores de transcripción pertenecientes a otras familias como AP2/EREBP, bZIP, C2C2-CO-like, C2H2, MYB, MYB-related, WRKY, MADS-box, ARF y Aux/IAA, entre otras. Tres de estas familias (bZIP, MYB y MADS-box) contenían la mayoría de los unigenes reprimidos, mientras que otras familias (MYB-related) contenían la mayoría de los unigenes inducidos. El resto de familias contenían unigenes, tanto inducidos como reprimidos.

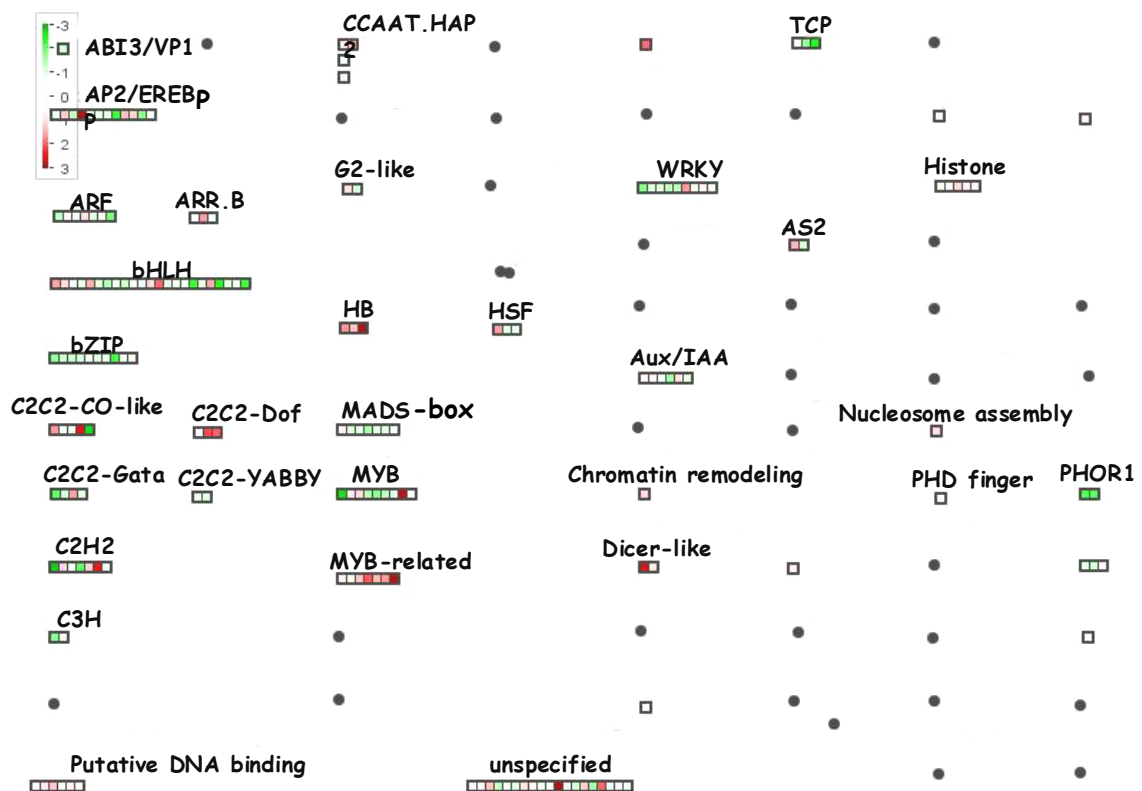


Figura 59. Visualización, mediante el programa Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos correspondientes a factores de transcripción y a otras proteínas de unión a DNA en los ovarios *PsEND1::barnasa*, en el estadio 1 de desarrollo, comparándolos con los ovarios silvestres. En color rojo se muestran los unigenes inducidos mientras que en color verde se muestran los unigenes reprimidos.

En nuestro experimento, el 85,7% de los genes MADS-box presentes en la micromatriz y expresados diferencialmente se encuentran reprimidos. Entre ellos destacan los unigenes homólogos a *AGL66*, *AGL16* y *AGL2* de *Arabidopsis thaliana* y un unigen homólogo a *CAGL2* de *Cucumis sativus*. Además destacan los unigenes

Tomato Agamous 1 (TAG1) y *Tomato Agamous like 6 (TAGL6)*, de *Solanum lycopersicum*.

Wang *et al.*, 2005 observó que el factor de transcripción del tipo AUX/IAA, IAA9 es un represor de la fructificación en tomate ya que reprime transcripcionalmente la expresión génica inducida por auxinas. La reducción de expresión del gen *IAA9* obtenida en líneas antisentido provoca el desarrollo de tomates partenocárpicos. Al comparar los genotipos silvestres con las líneas de tomate *IAA9* antisentido se observó que éstas presentaron niveles bajos de expresión, tras la fertilización, de los genes *TAG1* y *TAGL6*. La expresión de estos genes permanecía baja durante estadios posteriores del desarrollo temprano del fruto (Wang *et al.*, 2009). Estos autores sugirieron que los niveles de expresión bajos de estos genes promueven el desarrollo del fruto incluso sin polinización.

En nuestro análisis transcriptómico los genes *TAG1* y *TAGL6* han mostrado una represión fuerte desde estadios anteriores a la fecundación de los ovarios *PsEND1::barnasa* hasta el momento de la antesis. Este comportamiento es similar al descrito anteriormente por Wang *et al.*, 2005, la diferencia reside en que, en nuestro caso, la represión de estos genes está adelantada en el tiempo. Estos resultados sugieren que la represión en estadios tempranos de estos dos genes podría estar relacionada con la iniciación de la fructificación en los ovarios *PsEND1::barnasa*.

Estadio 4

En el conjunto de unigenes expresados diferencialmente en los ovarios transgénicos, en el estadio 4 del desarrollo, se identificaron 231 unigenes que codifican factores de transcripción. Este número de factores de transcripción que mostraron expresión diferencial es mayor que los encontrados en el estadio 1 de desarrollo.

En la Figura 60 se muestran las familias a las que pertenecen los factores de transcripción y otras proteínas de unión a DNA que se expresaron diferencialmente en el estadio 4 de desarrollo. Algunas de la familias de factores de transcripción presentaron un mayor número de unigenes inducidos que reprimidos; entre ellas destacan las familias AP2/EREBP, WRKY y bHLH. La primera, contiene 10 miembros expresados diferencialmente (7 de ellos inducidos y 3 reprimidos); la segunda, contiene 14 miembros, (11 reprimidos y 3 inducidos) y, la familia de los bHLH incluía 18 factores de transcripción, de los cuales estaban 13 inducidos y 5 reprimidos. Por el contrario otras familias de factores de transcripción presentaron un mayor número de miembros reprimidos que inducidos. Este es el caso de la familia HB, que presenta 17 miembros, 14 de los cuales estaban reprimidos y sólo 3 inducidos. Algo similar ocurrió

con la familia MADS-box, que incluía 7 miembros (5 reprimidos y sólo 2 inducidos). La familia MYB-related, está compuesta por 6 miembros y todos ellos estaban reprimidos.

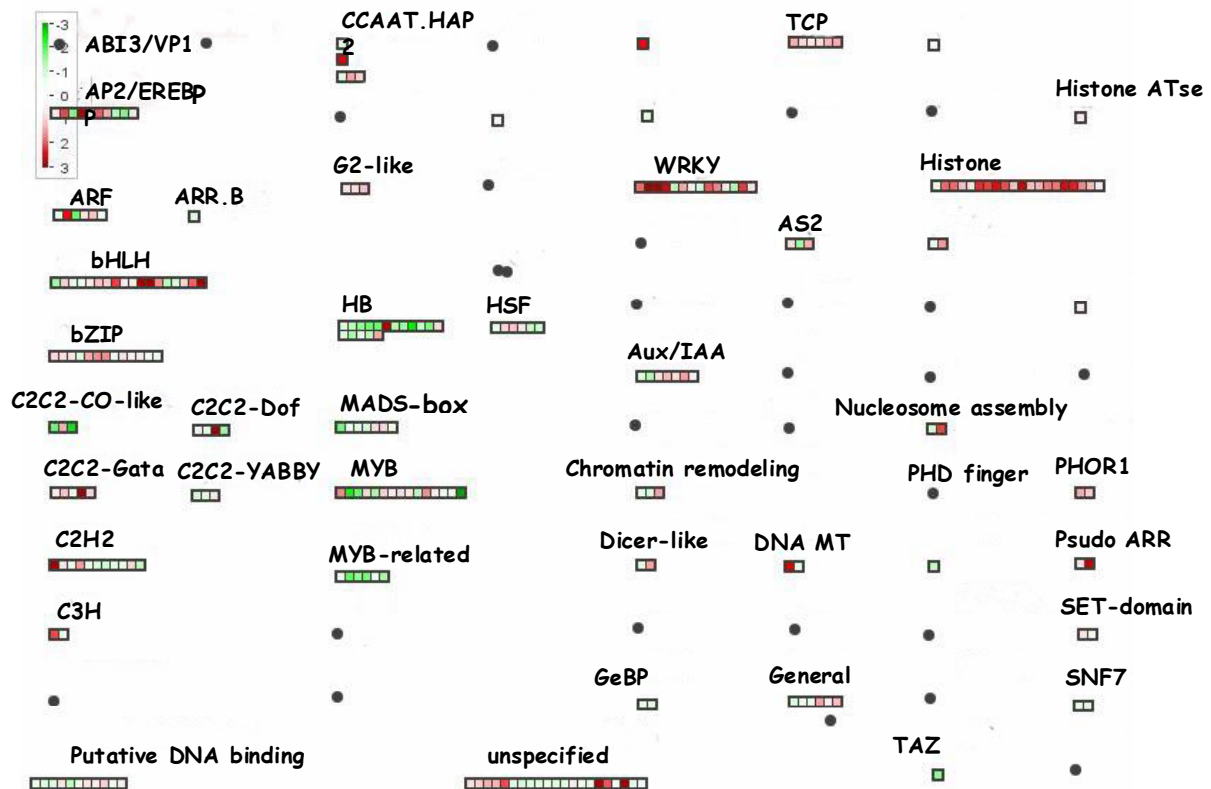


Figura 60. Visualización, mediante el programa Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos correspondientes a factores de transcripción y a otras proteínas de unión a DNA en los ovarios *PsEND1::barnasa*, en el estadio 4 de desarrollo, comparándolos con los ovarios silvestres. En color rojo se muestran los unigenes inducidos mientras que en color verde se muestran los unigenes reprimidos.

En nuestro experimento, el 70,40% de los genes MADS-box representados en la micromatriz y expresados diferencialmente se encuentran reprimidos. Entre ellos destacan los unigenes *Tomato Agamous like 11* (*TAGL11*) y *Tomato Agamous like 12* (*TAGL12*) de *Solanum Lycopersicum*, *AGL66* de *Arabidopsis thaliana* y *CAGL2* *Cucumis sativus*; todos ellos presentaron una represión fuerte. Estos dos últimos factores de transcripción estaban reprimidos en el estadio 1 y continúan reprimidos en este estadio.

Entre otras proteínas de unión a DNA destaca la familia de las histonas. Las histonas son proteínas de unión a DNA con un papel importante en la fase de división celular durante el crecimiento del fruto (Dong *et al.*, 1998; Van den Heuvel *et al.*, 1999). Antes de que una célula pueda comenzar la mitosis y dividirse, debe duplicar su DNA cromosómico y sintetizar mayor cantidad de histonas y otras proteínas sin las que la célula no podría dividirse correctamente. En nuestros resultados hemos encontrado expresados diferencialmente, 20 miembros de la familia de las histonas (19 de ellos

inducidos y sólo 1 reprimido). Entre los unigenes inducidos destacan unigenes con elevada similitud de secuencia con histonas de tipo 2A de *Oryza sativa* cv. japonica y unigenes con homología a otros que codifican histonas de tipo 3 de *Zea mays*.

Modificación y degradación de proteínas

Durante el desarrollo del fruto se produce la modificación de la estructura de las proteínas de manera que no pueden realizar correctamente su función; la célula activa diversos mecanismos para restablecer su síntesis y su estructura o acelerar su degradación en caso de no poder renaturalizarse.

Estadio 1

Un total de 46 unigenes involucrados en la modificación de proteínas han mostrado expresión diferencial. Se ha observado un elevado número de cambios relacionados con procesos de transducción de señal, realizados a través de cadenas de reacciones de fosforilación catalizadas por proteínas quinasas y fosfatasas. La mayoría de los unigenes pertenecientes a estas familias se encuentran reprimidos; entre ellos, destacan unigenes homólogos a otros que codifican proteínas CIPK10 y CIPK6, proteínas quinasas dependientes de calcio. También destaca un unigen fuertemente inducido que presenta homología con una proteína quinasa (ATMRK1) de *Arabidopsis thaliana*.

Respecto a los mecanismos de degradación de proteínas, el 30% de los unigenes que han mostrado expresión diferencial presentan homología con proteínas de tipo F-box y ubiquitinas de tipo "RING finger". El resto de unigenes implicados en esta categoría funcional han presentado alta homología de secuencia con poliubiquitinas, subtilasas, aminopeptidasas, cisteína proteasas y carboxipeptidasas, tanto inducidas como reprimidas. Entre el conjunto de unigenes fuertemente inducidos encontramos un unigen con homología a una serina carboxipeptidasa de *Arabidopsis thaliana*, una proteína serina subtilasa de *Solanum lycopersicum* y dos unigenes que presentan homología con unigenes que codifican con proteínas de la familia "RING finger" de *Solanum lycopersicum*. También encontramos un grupo de unigenes inducidos, homólogos a proteínas de *Arabidopsis thaliana*, que conforman distintas subunidades del proteosoma 26S. Además, también está inducido un unigen con homología al gen *SLEEPY1* (*SLY*), de *Arabidopsis thaliana*. Este gen codifica una proteína F-box del complejo de ubiquitinación (SCF^{SLY1}), implicada en la degradación de las proteínas DELLA dependiente de GAs (McGinnis *et al.*, 2003).

Estadio 4

En este estadio hemos observado expresión diferencial de 62 unigenes involucrados en la modificación de proteínas. La mayoría de ellos corresponden a unigenes que presentan homología con quinasas y fosfatasa, tanto inducidos como reprimidos.

En el proceso de degradación de proteínas han mostrado expresión diferencial proteínas de los mismos tipos que aparecían en el estadio 1. Entre el grupo de unigenes que se inducen fuertemente encontramos: una leucina aminopeptidasa de tomate, proteínas con homología a una leucina aminopeptidasa de *Arabidopsis thaliana*, unigenes homólogos a otros que codifican proteínas carboxipeptidasas de *Medicago truncatula* y *Arabidopsis thaliana* y, unigenes con homología a otros que codifican enzimas cisteína proteasas de *Arabidopsis thaliana*. Cabe destacar la represión que presenta el grupo de unigenes con homología a proteínas de *Arabidopsis thaliana* que conforman distintas subunidades del proteosoma 26S, ya que en el estadio 1 estaban inducidos.

Metabolismo de hormonas

Sin descartar la participación de otras hormonas en el desarrollo partenocárpico del fruto, varios estudios en líneas partenocárpicas de tomate han demostrado que las hormonas más relevantes en la partenocarpia son las auxinas y las giberelinas (Mapelli *et al.*, 1978; Bohner y Bangerth, 1988; Gustafson, 1936). Por otra parte, la aplicación exógena de estas hormonas induce la fructificación de ovarios no polinizados en tomate, lo cual sugiere un papel importante de estas hormonas en la fructificación y desarrollo del fruto (Gustafson, 1936; Sjut y Bangerth, 1981; Bünger-Kibler y Bangerth, 1982-1983, Alabadí *et al.*, 1996).

Por estos motivos hemos analizado en profundidad genes relacionados con el metabolismo, regulación y transporte de giberelinas y auxinas. Las giberelinas representan el 10,44% del total de unigenes que conforman la categoría funcional "Hormonas" de la micromatriz TOM2 mientras que las auxinas representan el 32,54%. La posible función de los unigenes se asignó en base a la función de la proteína más similar tras un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Este programa permite comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Esta base de datos almacena y actualiza constantemente la información referente a secuencias genómicas (en GenBank), un índice de artículos científicos referentes a biomedicina, biotecnología, bioquímica, genética y genómica (en PubMed), una recopilación de enfermedades genéticas humanas (en OMIM), además de otros datos biotecnológicos de relevancia.

Estadio 1

El 17,14% de los unigenes relacionados con giberelinas y el 21% de los unigenes relacionados con auxinas han mostrado expresión diferencial. En la Tabla 28 se muestran los unigenes analizados en profundidad involucrados con en el metabolismo, regulación, respuesta y transporte de giberelinas y auxinas.

Tabla 28. Unigenes expresados diferencialmente en ovarios *PsEND1::barnasa* en el estadio 1 de desarrollo implicados en el metabolismo, regulación, respuesta y transporte de giberelinas y auxinas. Las casillas con sombreado en rojo representan los unigenes inducidos mientras que las casillas con sombreado verde representan unigenes reprimidos.

Unigenes relacionados con Giberelinas			
Cambio de expresión	Nº de identificación en TOM2	Accesión NCBI	Anotación y posible función (Genbank)
4,886	opLeV0100003867	CAC44012.1	Proteína snakin2 (<i>S. tuberosum</i>). Regulación mediante GAs
4,547	opLeV0100003202	BAD17856.1	GA 2ox 2 (<i>N. tabacum</i>). Metabolismo de GAs
1,958	opLeV0100007067	NP_175691.1	2-oxoglutarato dioxigenasa (<i>A. thaliana</i>). Metabolismo de GAs
-1,204	opLeV0100005255	AAK11564.1	Oxidasa del ácido ent-kaurenoico (KAO1) (<i>A. thaliana</i>). Metabolismo de GAs
-2,095	opLeV0100008189	P27057	Proteína GAST1 (<i>L. esculentum</i>). Respuesta a GAs
-2,27	opLeV0100009127	P47926	Proteína RSI1 (<i>L. esculentum</i>). Respuesta a GAs
Unigenes relacionados con auxinas			
Cambio de expresión	Nº de identificación en TOM2	Accesión NCBI	Anotación y posible función (Genbank)
3,24	opLeV0100004643	AAT47070.1	Proteína regulada por auxinas (<i>O. sativa</i>). Respuesta a auxinas
2,68	opLeV0100005832	P24805	Proteína TSJT (<i>N. tabacum</i>). Respuesta a auxinas
2,60	opLeV0100007552	P40691.1	Proteína inducida por auxinas PCNT115 (<i>N. tabacum</i>) Respuesta a auxinas
2,49	opLeV0100005805	AAS75891.1	Proteína reprimida por auxinas (<i>S. virginianum</i>). Respuesta a auxinas
2,00	opLeV0100000167	AAS02074.1	Proteína GH3-like (<i>C. chinense</i>). Respuesta a auxinas
1,47	opLeV0100003270	AAA61967.1	Proteína desconocida (<i>S. lycopersicum</i>).
0,96	opLeV0100010924	AAS75891.1	Proteína regulada por auxinas (<i>S. virginianum</i>). Respuesta a auxinas
0,90	opLeV0100009645	AAT47070.1	Proteína GH3 regulada por auxinas (<i>O. sativa</i>). Respuesta a auxinas
0,85	opLeV0100007732	NP_191628.1	Proteína de respuesta por auxinas (<i>A. thaliana</i>)
0,60	opLeV0100004736	A84902	Proteína GH3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
-0,59	opLeV0100003965	AAK53036.1	Proteína desconocida (<i>A. thaliana</i>).
-0,63	opLeV0100003091	BAB03030.1	Proteína desconocida (<i>A. thaliana</i>).
-0,82	opLeV0100005071	NP_175587.1	Proteína IAR3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
-0,95	opLeV0100004297	NP_566763.1	Proteína de respuesta por auxinas (<i>A. thaliana</i>)
-1,02	opLeV0100000105	NP_566356.1	Proteína IAR3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
-1,41	opLeV0100001435	CAA05999.1	Proteína relacionada tuberización (<i>S.tuberosum</i>). Respuesta a auxinas
-1,51	opLeV0100008022	AAL47444.1	Proteína AT5g54510/F24B18_13. Respuesta a auxinas
-1,52	opLeV0100008632	AAM54033.1	Proteína PIN1 (<i>P. tremula</i> X <i>P. tremuloides</i>). Transporte de auxinas
-1,54	opLeV0100002725	NP_175587.1	Proteína IAR3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
-2,08	opLeV0100010796	NP_195730.1	Proteína desconocida (<i>A. thaliana</i>)
-2,94	opLeV0100006839	NP_567135.1	Proteína TIR (<i>A. thaliana</i>). Transporte de auxinas
-2,95	opLeV0100004539	AAM54033.1	Proteína PIN1 (<i>P. tremula</i> X <i>P. tremuloides</i>). Transporte de auxinas
-3,14	opLeV0100010785	NP_565261.1	Proteína PIN4 (<i>A. thaliana</i>). Transporte de auxinas

GIBERELINAS

Los genes pertenecientes a la familia GASA (gibberellic acid-stimulated Arabidopsis) se inducen mediante GAs (Aubert *et al.*, 1998) y están implicados en procesos de división y elongación celular, floración y desarrollo de raíz, fruto y semillas (Ben-Nissan *et al.*, 2004; De la Fuente *et al.*, 2006; Roxrud *et al.*, 2007).

En nuestros resultados de micromatrices tres unigenes que codifican miembros de la familia GASA/GAST/Snakin han mostrado expresión diferencial, uno de ellos inducido y dos reprimidos. El unigen inducido es un homólogo a la proteína snakin 2 de *Solanum tuberosum*, mientras que los dos unigenes reprimidos codifican proteínas GAST1/RSI1 de tomate. El resto de unigenes que han mostrado expresión diferencial corresponden a enzimas implicadas en el metabolismo de las GAs. En las primeras etapas de la ruta de biosíntesis de GAs el *ent*-kaureno se convierte en ácido *ent*-kaurenóico y posteriormente en GA₁₂ por una serie de reacciones oxidativas catalizadas por monooxigenasas de tipo citocromo P450. Posteriormente se lleva a cabo la oxidación de la GA₁₂ a GAs de 19 ó 20 átomos de carbono; estas reacciones constituyen los últimos pasos de la ruta de biosíntesis de GAs y están catalizadas por dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (GA20ox, GA3ox y GA2ox) (Hedden y Phillips, 2000a; Talón, 2000).

En nuestro análisis hemos encontrado reprimido un unigen con homología a una oxidasa del ácido *ent*-kaurenóico, KAO1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta enzima cataliza la oxidación del ácido *ent*-kaurenóico para obtener GA₁₂. También hemos encontrado unigenes inducidos que codifican enzimas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato que catalizan las últimas etapas de la síntesis de GAs. Entre ellas destaca un unigen homólogo a la enzima GA2ox2 de *Nicotiana tabacum* y un unigen que presentan homología con una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato, aunque no sabemos de qué tipo. Los genes GA2ox codifican las enzimas encargadas de la inactivación de GAs activas, ya que oxidan el C-2 de sus sustratos (GAs activas y sus precursores) originando compuestos 2β-hidroxilados inactivos (Ross *et al.*, 1995). Estos resultados parecen sugerir que en este estadio de desarrollo, en los ovarios *PsEND1::barnasa* las etapas tempranas de la síntesis de GAs estarían reprimidas mientras que la degradación de GAs estaría inducida.

AUXINAS

Un total de 23 unigenes relacionados con auxinas se han expresado diferencialmente, aproximadamente el 50% inducidos y el 50% reprimidos. Estos unigenes están implicados en el transporte y respuesta a auxinas.

Entre los unigenes inducidos por auxinas destacan tres unigenes con homología a genes *GH3*, que codifican enzimas IAA amido-sintasa. En estudios realizados *in vitro* se ha visto que estas enzimas se inducen a concentraciones elevadas de auxinas conjugando el exceso de auxinas existente con azúcares, péptidos o aminoácidos (Staswick *et al.*, 2005). Estos conjugados participan en el almacenamiento, transporte y compartimentalización de auxinas regulando así el nivel total de auxinas existente (LeClere *et al.*, 2002). En nuestro análisis hemos observado que, entre los unigenes reprimidos encontramos tres unigenes implicados en la respuesta a auxinas con homología a genes *IAR* de *Arabidopsis thaliana* y 4 unigenes relacionados con el transporte de auxinas, con homología a los genes *PIN* y *TIR*. Los genes *IAR* codifican enzimas IAA-amidohidrolasas, encargadas de actuar sobre los conjugados IAA-aminoácidos para producir IAA libre (LeClere *et al.*, 2002). El gen *TIR*, es un receptor de auxinas cuya función es facilitar la degradación del complejo AUX/IAA y eliminar sus efectos de represión sobre los genes de respuesta a auxinas. La represión de este gen conlleva estabilización del complejo AUX/IAA y el mantenimiento de sus efectos de represión (Kazan *et al.*, 2009). Los genes *PIN* participan en el transporte polar y distribución de auxinas necesario para una gran cantidad de procesos del desarrollo en la planta.

Estos resultados sugieren que, en este momento del desarrollo, existe un nivel de auxinas elevado en los ovarios *PsEND1::barnasa* ya que, se observa una inducción de los unigenes implicados en la formación de conjugados de IAA (sintetizados cuando los niveles de IAA son elevados) y represión de los unigenes implicados en la hidrólisis de los conjugados de IAA (hidrolizados cuando hay un déficit de IAA).

Estadio 4

El 20% de los unigenes relacionados con giberelinas y el 20,18% de los unigenes relacionados con auxinas han mostrado expresión diferencial. En la Tabla 29 se muestran los unigenes analizados en profundidad involucrados con en el metabolismo, respuesta y transporte de giberelinas y auxinas.

Tabla 29. Unigenes expresados diferencialmente en ovarios *PsEND1::barnasa* en el estadio 4 de desarrollo implicados en el metabolismo, regulación, respuesta y transporte de giberelinas y auxinas. Las casillas con sombreado en rojo representan los unigenes inducidos mientras que las casillas con sombreado verde representan unigenes reprimidos.

Unigenes relacionados con Giberelinas			
Cambio de expresión	Nº de identificación en TOM2	Accesión NCBI	Anotación y posible función (Genbank)
3,39	opLeV0100008189	P27057	Proteína GAST1 (<i>L. esculentum</i>). Respuesta a GAs.
3,23	opLeV0100004746	AAO23063.1	Oxidasa del ácido ent-kaurenóico (KAO) (<i>P. sativum</i>). Metabolismo de GAs
2,186	opLeV0100009127	P47926	Proteína RSI1 (<i>L. esculentum</i>). Respuesta a GAs
1,102	opLeV0100005255	AAK11564.1	Oxidasa del ácido ent-kaurenóico (KAO1) de <i>A. thaliana</i> . Metabolismo de GAs
-1,555	opLeV0100001910	BAD17856.1	GA 2ox 2 (<i>N. tabacum</i>). Metabolismo de GAs
-1,874	opLeV0100003867	CAC44012.1	Proteína snakin2 (<i>S. tuberosum</i>). Regulación mediante GAs
-2,779	opLeV0100003202	BAD17856.1	GA 2ox 2 (<i>N. tabacum</i>). Metabolismo de GAs
Unigenes relacionados con auxinas			
Cambio de expresión	Nº de identificación en TOM2	Accesión NCBI	Anotación y posible función (Genbank)
3,38	opLeV0100001435	CAA05999.1	Proteína relacionada tuberización (<i>S. tuberosum</i>). Respuesta a auxinas
2,98	opLeV0100003965	AAK53036.1	Proteína desconocida (<i>A. thaliana</i>)
2,08	opLeV0100005071	NP_175587.1	Proteína IAR3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
1,87	opLeV0100000105	NP_566356.1	Proteína IAR3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
1,71	opLeV0100005805	AAS75891.1	Proteína reprimida por auxinas (<i>S. virginianum</i>). Respuesta a auxinas
1,64	opLeV0100005541	NP_911736.1	Proteína IAA amidohidrolasa (<i>O. sativa</i>) Respuesta a auxinas
1,59	opLeV0100010796	NP_195730.1	Proteína desconocida (<i>A. thaliana</i>)
1,52	opLeV0100002725	NP_175587.1	Proteína IAR3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
1,41	opLeV0100010347	AAL47552.1	Proteína IAA amidohidrolasa (<i>O. sativa</i>). Respuesta a auxinas
0,96	opLeV0100003270	AAA61967.1	Proteína desconocida (<i>S. lycopersicum</i>)
0,94	opLeV0100001409	NP_568528.2	Proteína axi1 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
0,83	opLeV0100011077	AAK84479.1	Proteína axi1 (<i>L. esculentum</i>). Respuesta a auxinas
0,81	opLeV0100011397	NP_192249.1	Proteína GH3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
0,71	opLeV0100007632	NP_175587.1	Proteína IAR3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
0,59	opLeV0100011248	F6D8.15	Proteína F6D8.15 (<i>A. thaliana</i>). Desconocida
-0,94	opLeV0100005832	P24805	Proteína TSJT (<i>N. tabacum</i>). Respuesta a auxinas
-0,95	opLeV0100009645	AAT47070.1	Proteína GH3 regulada por auxinas (<i>O. sativa</i>). Respuesta a auxinas
-1,16	opLeV0100004736	A84902	Proteína GH3 (<i>A. thaliana</i>). Respuesta a auxinas
-1,59	opLeV0100008632	AAM54033.1	Proteína PIN1 (<i>P. tremula</i> X <i>P. tremuloides</i>) Transporte de auxinas
-2,54	opLeV0100000167	AAS02074.1	Proteína GH3-like (<i>C. chinense</i>). Respuesta a auxinas
-2,75	opLeV0100006839	NP_567135.1	Proteína TIR (<i>A. thaliana</i>). Transporte de auxinas
-4,05	opLeV0100010785	NP_565261.1	Proteína PIN 4 (<i>A. thaliana</i>). Transporte de auxinas

GIBERELINAS

En nuestros resultados de micromatrices tres unigenes que codifican miembros de la familia GASA/GAST/Snakin han mostrado expresión diferencial, uno de ellos reprimido y dos inducidos. Estos tres unigenes son los mismos que aparecían expresados diferencialmente en el estadio 1, la diferencia está en que, el unigen homólogo a la proteína snakin 2 de *Solanum tuberosum* que, en el estadio 1 estaba inducido, en este estadio está reprimido. Por el contrario, los dos unigenes reprimidos en el estadio 1, que codifican proteínas GAST1/RSI1 de tomate, en este estadio están inducidos.

Análogamente, también encontramos los mismos unigenes expresados diferencialmente que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de las GAs. En primer lugar hemos encontrado inducidos dos unigenes con homología a oxidasas del ácido ent-kaurenoico, KAO1, de *Arabidopsis thaliana*; en el estadio 1 sólo se expresó diferencialmente uno de ellos y estaba reprimido. También hemos encontrado dos unigenes reprimidos homólogos a enzimas GA2ox2 de *Nicotiana tabacum* que aparecían diferencialmente expresados en el estadio 1 pero, inducidos. Estos resultados parecen indicar que en este estadio de desarrollo la biosíntesis temprana de GAs está inducida mientras que la degradación de las GAs está reprimida.

AUXINAS

Un total de 22 unigenes relacionados con auxinas se han expresado diferencialmente, el 68,18% inducidos y el 31,82% reprimidos. Estos unigenes están implicados en el transporte y respuesta a auxinas. Entre los unigenes inducidos encontramos cuatro unigenes implicados en la respuesta a auxinas con homología a genes *IAR* de *Arabidopsis thaliana*; tres de estos unigenes son los mismos que habían mostrado represión en el estadio 1.

Respecto a los unigenes reprimidos se encuentran tres unigenes con homología a genes *GH3*, que codifican enzimas IAA amido-sintasa y 3 unigenes relacionados con el transporte de auxinas (2 de ellos con homología a genes *PIN* de diferentes especies y uno con homología a una proteína TIR de *Arabidopsis thaliana*).

Estos resultados sugieren que, en este momento del desarrollo, existe un nivel de auxinas bajo en los ovarios *PsEND1::barnasa* ya que, se observa una represión de los unigenes implicados en la formación de conjugados de IAA (sintetizados cuando los niveles de IAA son elevados) e inducción de los unigenes implicados en la hidrólisis de los conjugados de IAA (hidrolizados cuando hay un déficit de IAA).

6.4. Agrupamiento de los genes expresados diferencialmente en función de patrones comunes de expresión temporal

Se realizó un análisis de agrupamiento no jerárquico en grupos SOM ('Self Organizing Maps' o mapas auto-organizativos) utilizando el algoritmo de agrupamiento génico de la aplicación informática Acuity 4.0, utilizando distancias euclídeas como medida de similitud entre genes y centrando los datos (Figura 61). Este análisis permitió organizar los unigenes expresados diferencialmente en cada estadio de desarrollo en cuatro grupos de unigenes con perfiles de expresión común, ya que este número de grupos contempla los diferentes comportamientos temporales de expresión de los unigenes.

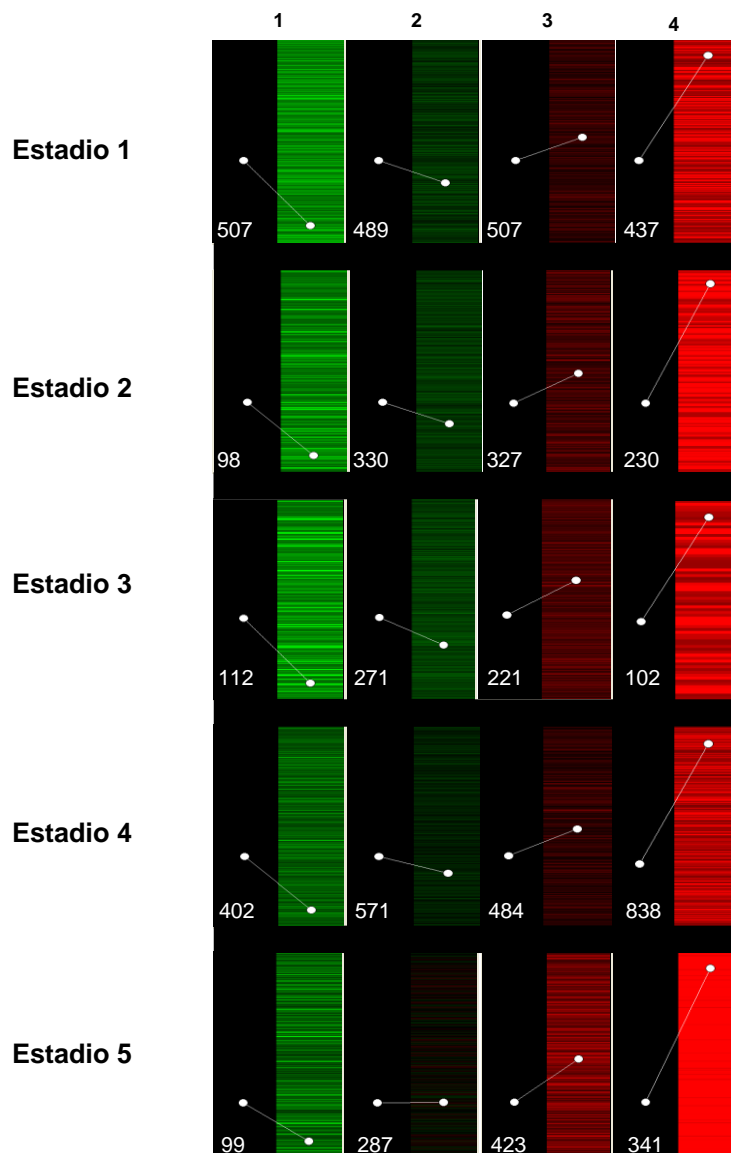


Figura 61. Análisis de agrupamiento no jerárquico según mapas auto-organizativos (SOMs) de los datos de expresión de los genes expresados diferencialmente durante los 5 estadios de desarrollo estudiados. Para cada estadio se muestra el agrupamiento en 4 grupos SOM (columnas marcadas del 1 al 4). En las columnas de la derecha se representan el genotipo transgénico, en rojo (inducción) y en verde (represión) y, en las columnas de la izquierda se representa, en color negro, el genotipo silvestre. En cada SOM aparece la línea de tendencias representativa del perfil promedio de expresión de los unigenes incluidos en el grupo y el número de unigenes que se incluyen dentro del perfil (abajo izquierda).

Los mapas auto-organizativos, correspondientes a los cinco estadios estudiados, representan valores de expresión para cada gen (fila) para los genotipos *PsEND1::barnasa* y silvestre (columnas). En ellos se muestran los valores de expresión normalizados respecto al genotipo silvestre, que se encuentra situado en las columnas de la izquierda de color negro (Figura 61). En cada uno de los 5 estadios de desarrollo estudiados se han realizado 4 grupos SOM, de los cuales 2 correspondieron a unigenes que se inducen y 2 a unigenes que se reprimen con respecto al genotipo silvestre. Cada uno de estos dos grupos de unigenes se divide a su vez en genes con inducción o represión fuerte y en unigenes con inducción o represión moderada.

En una visión general de los datos del SOM se observa que los cambios más drásticos (teniendo en cuenta tanto la magnitud de los cambios de expresión como el número de genes diferencialmente expresados) ocurren en los estadios 1 y 4. Los estadios 2, 3 y 5 constituyen estadios con menor actividad transcripcional.

En el estadio 1, el grupo constituido por unigenes con represión fuerte contiene 507 unigenes (26,13% del total de unigenes expresados en este estadio). El grupo formado por unigenes moderadamente reprimidos está constituido por 489 unigenes (25,21% del total de unigenes expresados en este estadio). Los unigenes inducidos se clasifican en dos grupos: uno que contiene 437 unigenes con inducción fuerte (22,53% del total de unigenes expresados en este estadio) y otro grupo, que contiene 507 unigenes con inducción moderada (26,13% del total de unigenes expresados en este estadio).

En el estadio 2 el grupo constituido por unigenes con represión fuerte contiene 98 unigenes (9,95% del total de unigenes expresados en este estadio). El grupo formado por unigenes moderadamente reprimidos está constituido por 330 unigenes (33,50% del total de unigenes expresados en este estadio). Los unigenes inducidos se clasifican en dos grupos: uno que contiene 230 unigenes con inducción fuerte (23,35% del total de unigenes expresados en este estadio) y otro grupo, que contiene 327 unigenes con inducción moderada (33,20% del total de unigenes expresados en este estadio).

En el estadio 3 el grupo constituido por unigenes con represión fuerte contiene 112 unigenes (15,87% del total de genes expresados en este estadio). El grupo formado por unigenes moderadamente reprimidos está constituido por 271 unigenes (38,38% del total de unigenes expresados en este estadio). Los unigenes inducidos se clasifican en dos grupos: uno que contiene 102 unigenes con inducción fuerte (14,45% del total de unigenes expresados en este estadio) y otro grupo, que contiene 221 unigenes con inducción moderada (31,30% del total de unigenes expresados en este estadio).

En el estadio 4 el grupo constituido por unigenes con represión fuerte contiene 402 unigenes (17,52% del total de genes expresados en este estadio). El grupo formado por unigenes moderadamente reprimidos está constituido por 571 unigenes (24,88% del total de unigenes expresados en este estadio). Los unigenes inducidos se clasifican en dos grupos: uno que contiene 838 unigenes con inducción fuerte (36,51% del total de unigenes expresados en este estadio) y otro grupo, que contiene 484 unigenes con inducción moderada (21,09% del total de unigenes expresados en este estadio).

En el estadio 5 el grupo constituido por unigenes con represión fuerte contiene 99 unigenes (8,61% del total de unigenes expresados en este estadio). El grupo formado por unigenes moderadamente reprimidos está constituido por 287 unigenes (24,96% del total de unigenes expresados en este estadio). Los unigenes inducidos se clasifican en dos grupos: uno que contiene 341 unigenes con inducción fuerte (29,65% del total de unigenes expresados en este estadio) y otro grupo, que contiene 423 unigenes con inducción moderada (36,78% del total de unigenes expresados en este estadio).

7. Análisis de la expresión de genes relacionados con giberelinas y auxinas en ovarios de plantas *PsEND1::barnasa* mediante qRT-PCR

Los resultados previos que hemos obtenido en nuestros experimentos parecen indicar que, en el desarrollo partenocárpico de los frutos *PsEND1::barnasa* están implicadas las GAs y las auxinas. Las evidencias en las que nos hemos basado se exponen a continuación. En primer lugar, el análisis transcriptómico realizado mediante micromatrices ha permitido identificar una serie de genes relacionados con GAs y auxinas cuya expresión está alterada en los ovarios *PsEND1::barnasa* respecto a los silvestres. En segundo lugar, la aplicación de un inhibidor de la síntesis de GAs (paclobutrazol) a ovarios *PsEND1::barnasa* inhibe su desarrollo y, este efecto es revertido por la aplicación de GA₃.

Teniendo en cuenta estas evidencias, procedimos a estudiar la actividad transcripcional de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de GAs y de genes de las familias Aux/IAA y ARF (implicados en la respuesta a auxinas), en los ovarios *PsEND1::barnasa* mediante qRT-PCR.

7.1. Genes que codifican enzimas del metabolismo de las GAs

En diversas especies se han clonado la mayoría de los genes que codifican los enzimas del metabolismo de GAs, excepto el gen que codifica la GA13-oxidasa (GA13ox)(Hedden y Phillips, 2000a). Las enzimas que catalizan los primeros pasos de la biosíntesis de GAs están codificados por uno o dos genes (revisado en Yamaguchi, 2007). Las enzimas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (GA20-oxidasas, GA3-oxidasas y GA2-oxidasas) catalizan la última parte de la biosíntesis de GAs y están codificadas por familias multigénicas que presentan un patrón específico de expresión para cada uno de los individuos de la familia multigénica, (revisado en Hedden y Phillips, 2000a). La sobreexpresión de GA 20-oxidasa en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* puede producir una alteración de las concentraciones de GAs activas, lo que estaría indicando que una regulación de estos genes sería crucial en la modulación del flujo en la parte final de la ruta (Hedden y Phillips, 2000a; Yamaguchi y Kamiya, 2000).

Con el objetivo de cuantificar la expresión de los genes que codifican enzimas implicadas en los últimos pasos de la ruta de síntesis de GAs hemos seleccionado 10 genes y los hemos estudiado por qRT-PCR en ovarios silvestres y *PsEND1::barnasa* en 5 estadios de desarrollo. Los genes seleccionados codifican enzimas GA 20 oxidasas (GA20ox1, GA20ox2 y GA20ox3) y GA 3 oxidasas (GA3ox1 y GA3ox2), implicadas en la activación de las GAs y enzimas GA2ox (GA2ox1, GA2ox2, GA2ox3, GA2ox4 y GA2ox5), encargadas de la inactivación de las GAs.

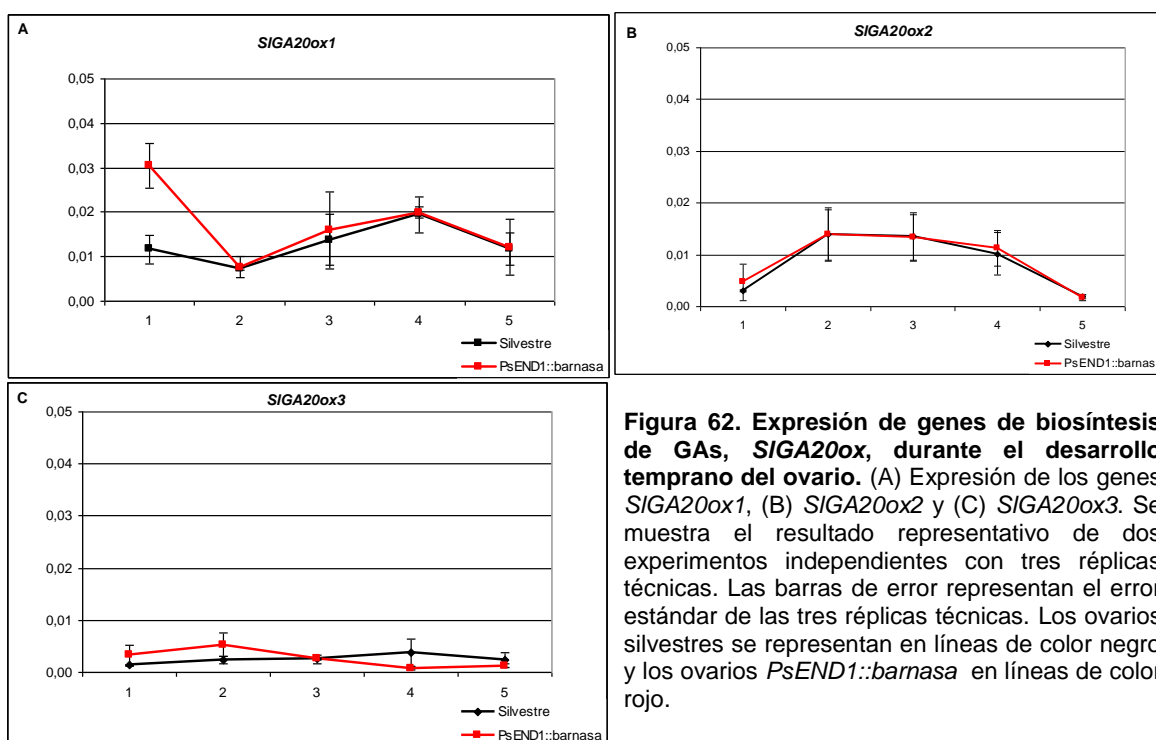
Los niveles de expresión de los genes se determinaron mediante qRT-PCR (9. Materiales y Métodos) y se normalizaron respecto al nivel de expresión de la ubiquitina, utilizada como control con expresión constitutiva.

Los diferentes genes que codifican GA 20-oxidasas en *Solanum lycopersicum* tienen un patrón de expresión diferencial durante el desarrollo de las yemas florales (Rebers *et al.*, 1999). Los niveles de transcritos de *SIGA20ox1* y *SIGA20ox2* en ovarios en estadios tempranos del desarrollo floral son bajos o indetectables pero, estos niveles aumentan en estadios previos a la antesis (Rebers *et al.*, 1999). En la antesis los niveles de transcritos de *SIGA20ox1* son altos y, justo después de la antesis los niveles de transcritos se reducen drásticamente para volver a aumentar de nuevo en las etapas tempranas de desarrollo del fruto (Rebers *et al.*, 1999). Por su parte, los niveles de los transcritos del gen *SIGA20ox2* son bajos en el momento de la antesis y continúan siendo bajos durante la senescencia de la flor y el desarrollo temprano del fruto.

Los niveles de los transcritos del gen *SIGA20ox3* son relativamente bajos y constantes desde los estadios tempranos del desarrollo de la flor hasta la antesis. Durante la senescencia de la flor y el desarrollo temprano del fruto los niveles de transcritos de *SIGA20ox3* aumentan (Rebers *et al.*, 1999).

En la Figura 62 se muestran los niveles de expresión de los genes *SIGA20ox1* (AF049898), *SIGA20ox2* (AF049899) y *SIGA20ox3* (AF049900). Nuestros resultados obtenidos en el análisis por qRT-PCR parecen confirmar las diferencias existentes entre los patrones de expresión temporal de los genes *SIGA20ox*.

El nivel de transcritos del gen *SIGA20ox1* en el estadio 1 de desarrollo fue 2,60 veces superior en los ovarios del genotipo *PsEND1::barnasa* que en los silvestres. En el resto de estadios de desarrollo no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de los ovarios transgénicos y silvestres (Figura 62A). El nivel de transcritos de los genes *SIGA20ox2* y *SIGA20ox3* a lo largo de los 5 estadios de desarrollo fue similar en los ovarios *PsEND1::barnasa* y silvestres (Figura 62 B y C).



En diversos estudios realizados en tomate durante el desarrollo floral, se ha visto que los transcritos del gen *SIGA3ox1* son detectables en ovarios no polinizados y polinizados y, permanecen relativamente constantes hasta 20 días después de la antesis. En lo que respecta al gen *SIGA3ox2*, cabe mencionar que sus transcritos son indetectables en ovarios no polinizados y ovarios polinizados, tanto en el momento de la antesis como en estadios posteriores del desarrollo del fruto (Serrani *et al.*, 2007b).

Esto sugiere que la actividad de los genes *SIGA3ox* está presente en ovarios antes de la polinización y que ésta no altera su actividad (Serrani *et al.*, 2007b).

En la Figura 63 se muestran los niveles de expresión de los genes *SIGA3ox1* (AB010991) y *SIGA3ox2* (AB010992). Nuestros resultados obtenidos en el análisis por qRT-PCR indican que los niveles de expresión del gen *SIGA3ox1* son del orden de diez veces superiores a los niveles detectados para el gen *SIGA3ox2*.

En el estadio 1 de desarrollo, los niveles de transcritos del gen *SIGA3ox1* fueron 2,48 veces superiores a los encontrados en los ovarios silvestres. En el estadio 5 hemos observado niveles de transcritos ligeramente superior en los ovarios *PsEND1::barnasa* que en los silvestres. En el resto de estadios no se han observado diferencias entre un genotipo y otro.

En lo que respecta al gen *SIGA3ox2*, podemos observar que sus niveles de transcritos oscilan en unos estadios y otros. Podemos destacar que, en los estadios 3 y 5 de desarrollo, los ovarios silvestres presentan niveles de expresión menores que los ovarios *PsEND1::barnasa*, mientras que, en el estadio 4, son los ovarios *PsEND1::barnasa* los que presentan menores niveles de expresión.

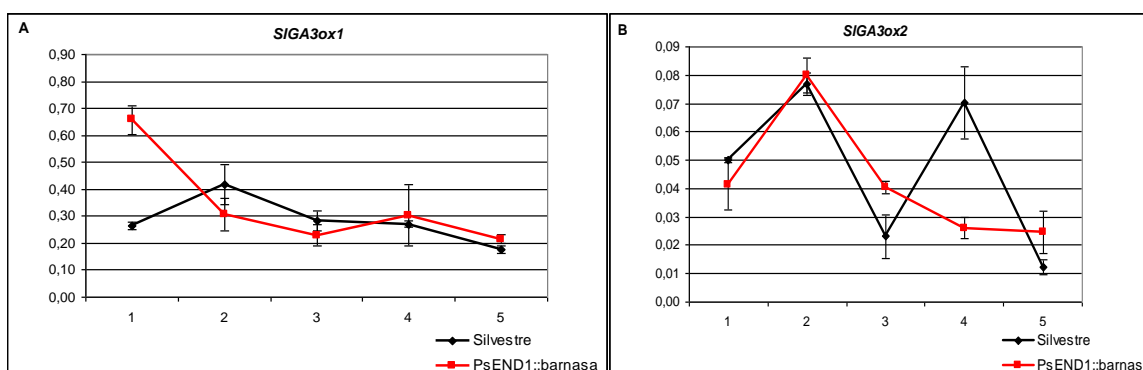


Figura 63. Expresión de los genes de biosíntesis de GAs, *SIGA3ox*, durante el desarrollo temprano del ovario. (A) Expresión de los genes *SIGA3ox1* y (B) *SIGA3ox2*. Se muestra el resultado representativo de dos experimentos independientes con tres réplicas técnicas. Las barras de error representan el error estándar de las tres réplicas técnicas. Los ovarios silvestres se representan en líneas de color negro y los ovarios *PsEND1::barnasa* en líneas de color rojo. En la figura A la escala oscila entre 0,00 y 0,90 mientras que en la figura B la escala oscila entre 0,00 y 0,09.

En estudios realizados anteriormente se observó que la expresión de los cinco genes aislados en tomate (*SIGA2ox*) está regulada a lo largo del desarrollo, estando presentes en estadios tempranos del desarrollo floral y manteniéndose en estadios más tardíos del desarrollo (Serrani *et al.*, 2007b). Todos ellos se expresan en ovarios no polinizados en el momento de la antesis y continúan expresándose en estadios posteriores del desarrollo del fruto. Sin embargo, en ovarios polinizados no se observa disminución de la expresión después de la antesis, cuando el desarrollo ya está en

curso. Esto significa que el efecto de la polinización en el desarrollo temprano del fruto no parece estar mediado por un efecto de inactivación de GAs a través de las GA2ox (Serrani *et al.*, 2007b).

En la Figura 64 se muestran los niveles de expresión de los genes *SIGA2ox1* (EF441351) y *SIGA2ox2* (EF441352), *SIGA2ox3* (EF441353), *SIGA2ox4* (EF441354) y *SIGA2ox5* (EF441355). Nuestros resultados obtenidos en el análisis por qRT-PCR indican que los genes *SIGA2ox1*, *SIGA2ox3* y *SIGA2ox5* (Figura 64A, C y E) han mostrado niveles de expresión del orden de 10 veces inferiores a los genes *SIGA2ox2* y *SIGA2ox4* (Figura 64B y D).

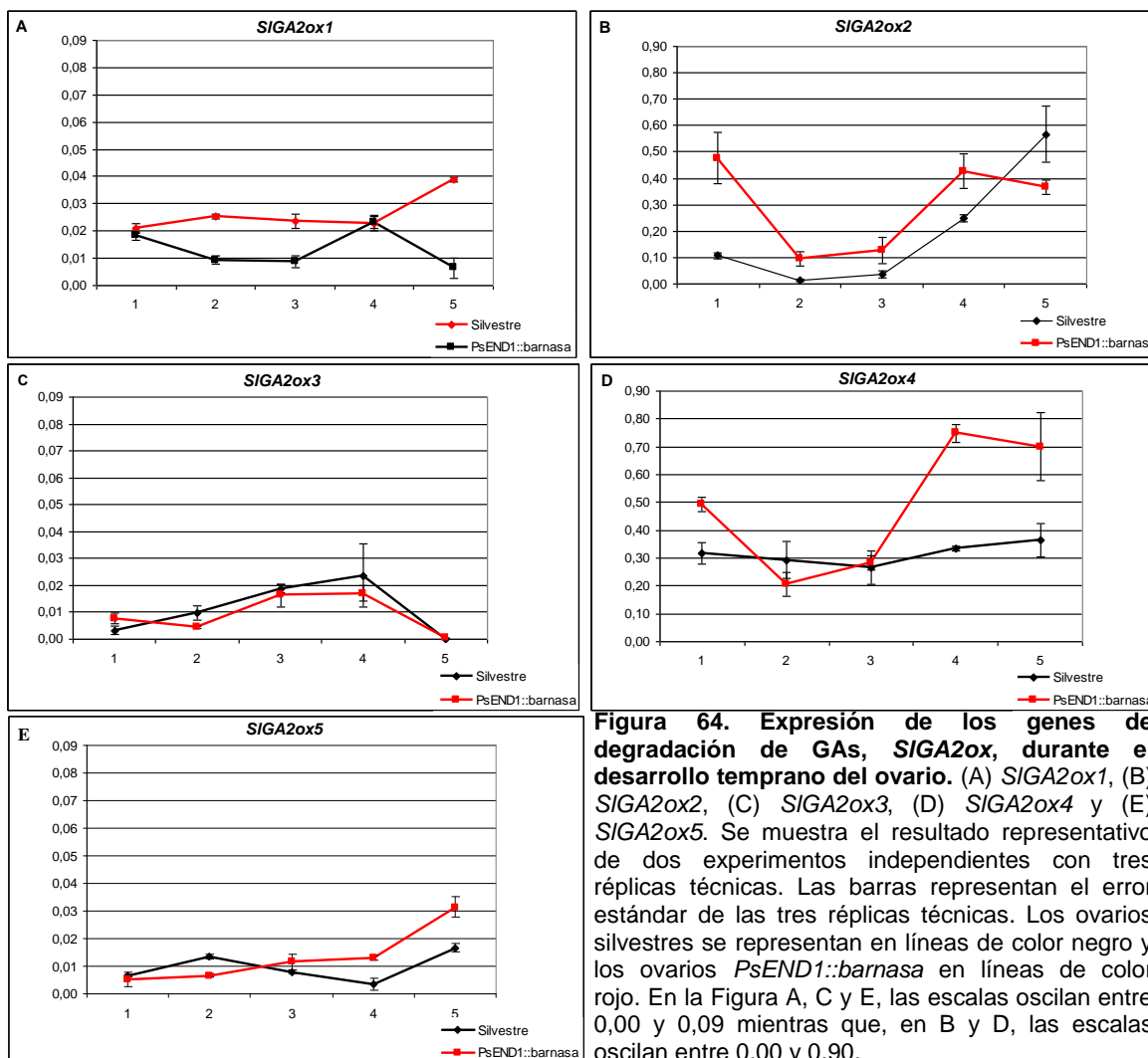
El gen *SIGA2ox1* presentó niveles de expresión similares en los estadios 1 y 4, tanto para los ovarios *PsEND1::barnasa* como para los ovarios silvestres. En el resto de estadios los niveles de expresión fueron superiores en los ovarios *PsEND1::barnasa* que en los silvestres.

Los niveles de transcritos del gen *SIGA2ox2* han sido superiores en los ovarios *PsEND1::barnasa* que en los ovarios silvestres a lo largo de los 4 primeros estadios de desarrollo estudiados; únicamente en el estadio 5 los niveles de transcritos fueron superiores en los ovarios silvestres. En el estadio 1 se observa la mayor diferencia de expresión entre ambos genotipos, encontrando en el genotipo *PsEND1::barnasa* un nivel de transcritos 4,44 veces superior al que observamos en los ovarios silvestres.

El gen *SIGA2ox3* presentó niveles de expresión similares en ambos genotipos; sólo se observa ligeras diferencias en los dos primeros estadios del desarrollo. El nivel de transcritos es ligeramente superior en el estadio 1 en el genotipo *PsEND1::barnasa* mientras que, en el estadio 2 es el genotipo silvestre el que presenta mayor nivel de transcritos.

Los niveles de transcritos del gen *SIGA2ox4* fueron superiores en el genotipo *PsEND1::barnasa* en los estadios 1, 4 y 5 del desarrollo. En el estadio 1 el nivel de transcritos fue 1,55 veces superior en los ovarios del genotipo *PsEND1::barnasa* que en los ovarios del genotipo silvestre. En los estadios 2 y 3 los niveles de transcritos fueron similares en ambos genotipos.

El gen *SIGA2ox5* presentó niveles de expresión superiores en los ovarios *PsEND1::barnasa* durante los estadios 4 y 5 de desarrollo; en cambio, sus niveles de expresión en el genotipo *PsEND1::barnasa* fueron inferiores en el estadio 2. En los estadios 1 y 3 los niveles de transcritos fueron similares en ambos genotipos.



7.2. Genes de señalización de auxinas pertenecientes a las familias Aux/IAA y ARF

Se ha descrito en bibliografía que líneas transgénicas que expresan el gen *IAA9* (perteneciente a la familia Aux/IAA) en antisentido desarrollan tomates partenocárpicos (Wang *et al.*, 2005). Estas líneas antisentido presentan modificaciones de los niveles de otro gen de la familia Aux/IAA, *IAA3*. En concreto, los niveles de *IAA3* aumentan en estas líneas transgénicas sugiriendo que *IAA9* actúa en estos genotipos como un represor transcripcional de la señalización mediante auxinas (Wang *et al.*, 2005).

Por otra parte, diversos autores han descrito que el factor de transcripción ARF8 de *Arabidopsis thaliana* actúa como represor de la fructificación (Goetz *et al.*, 2006). Las evidencias que se tienen al respecto son: en primer lugar, se ha visto que ARF8 de *Arabidopsis thaliana* está implicada en un complejo que reprime en el óvulo la inducción de la fructificación en ausencia de fecundación (Vivian-Smith *et al.*, 2001;

Goetz *et al.*, 2006). El mutante *fwf* de *Arabidopsis* presenta un fenotipo de fructificación partenocárpica al emascular las flores (Vivian-Smith *et al.*, 2001) causado por un defecto en el gen *ARF8* (Goetz *et al.*, 2006). En segundo lugar, *ARF8* forma parte de un complejo con proteínas Aux/IAA que inhibe la transcripción de los genes responsables de la iniciación de la fructificación. Al producirse la fecundación se produce un aumento de auxinas en el óvulo (Dorcey, *et al.*, 2009) que induce el desmantelamiento del complejo represor *ARF8*-Aux/IAA al degradarse la Aux/IAA, con lo que se evita la represión de los genes necesarios para inducir fructificación.

Recientemente se ha identificado un nuevo gen de respuesta a auxinas perteneciente a la familia *ARF7*, *SIARF7*. El silenciamiento de este gen utilizando RNA de interferencia permitió la obtención de frutos partenocárpicos sugiriendo que *SIARF7* actúa como un regulador negativo en el desarrollo del fruto (De Jong *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se ha estudiado la expresión, mediante qRT-PCR de los genes: *SIIAA3* (AF022014), *SIIAA9* (AJ937282), *SIARF7* (EF121545) y *SIARF8* (EF667342).

En la Figura 65 se muestran los niveles de expresión de los genes *SIIAA3* y *SIIAA9*. Nuestros resultados obtenidos en el análisis por qRT-PCR indicaron que los niveles de expresión del gen *SIIAA3* son similares en casi todos los estadios de desarrollo en los ovarios silvestres y *PsEND1::barnasa*. Únicamente, en el estadio 4 de desarrollo, los ovarios *PsEND1::barnasa* presentaron niveles de transcritos inferiores que los ovarios silvestres (Figura 65A).

Los niveles de transcritos del gen *SIIAA9* en el estadio 1 de desarrollo se redujeron a la mitad en los ovarios *PsEND1::barnasa* al compararlos con los silvestres (Figura 65B). En los estadios 2, 3 y 4 los niveles de transcritos del gen fueron similares en ambos genotipos. Únicamente en el estadio 5 de desarrollo los niveles de transcritos del gen fueron superiores en los ovarios *PsEND1::barnasa*.

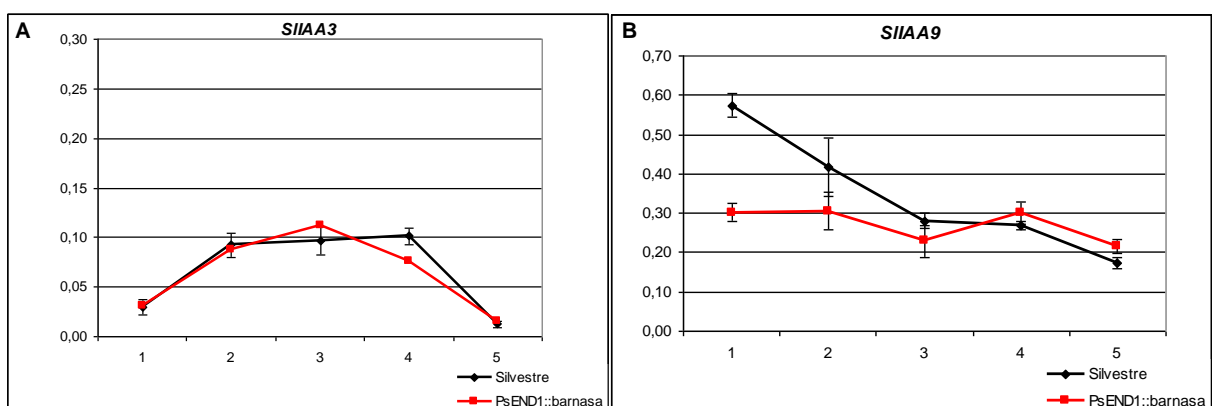


Figura 65. Expresión de 2 genes de la familia AUX/IAA de respuesta a auxinas durante el desarrollo temprano del ovario. (A) *SIIAA3* y (B) *SIIAA9*. Se muestra el resultado representativo de dos experimentos independientes con tres réplicas técnicas. Las barras de error representan el error estándar de las tres réplicas técnicas. Los ovarios silvestres se representan en líneas de color negro y los ovarios *PsEND1::barnasa* en líneas de color rojo.

Respecto al gen *SIARF7*, los resultados de qRT-PCR han mostrado que en el estadio 1 de desarrollo los niveles de expresión se han reducido un 20% en los ovarios *PsEND1::barnasa* respecto a los niveles de expresión en los ovarios silvestres (Figura 66A). En el resto de estadios de desarrollo los niveles de transcritos del gen fueron similares en los genotipos *PsEND1::barnasa* y silvestres.

Los niveles de transcritos del gen *SIARF8* fueron mayores en los ovarios *PsEND1::barnasa* durante los estadios 4 y 5 de desarrollo (Figura 66B). En el resto de estadios no hemos observado diferencias en los niveles de transcritos de este gen al comparar los ovarios *PsEND1::barnasa* y los silvestres.

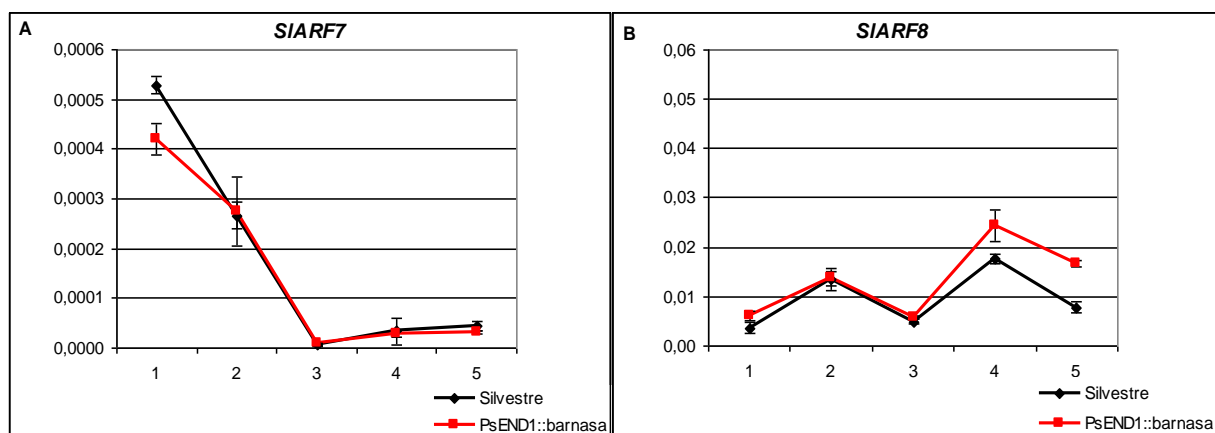


Figura 66. Expresión de 2 genes de respuesta a auxinas de la familia ARF durante el desarrollo temprano del ovario. (A) *SIARF7* y (B) *SIARF8*. Se muestra el resultado representativo de dos experimentos independientes con tres réplicas técnicas. Las barras de error representan los errores estándar de las tres réplicas técnicas. Los ovarios silvestres se representan en líneas de color negro y los ovarios *PsEND1::barnasa* en líneas de color rojo. En la Figura A, la escala oscila entre 0,0000 y 0,0006 mientras que, en B, la escala oscila entre 0,00 y 0,06.

V. Discusión



V. DISCUSIÓN

La ingeniería genética permite la transferencia selectiva de un gen o unos pocos genes deseables permitiendo que los mejoradores puedan desarrollar cultivares con caracteres específicos deseables sin incorporar aquellos que no lo son. Además, es posible utilizar genes de distintas procedencias eliminando las barreras sexuales entre especies. En especies hortícolas como el tomate la biotecnología puede servir para producir plantas con rendimientos más altos de cosecha, plantas que se protegen contra enfermedades, insectos y condiciones adversas así como tomates más nutritivos y con mejor sabor. Además, también se busca conseguir plantas androestériles y frutos partenocárpicos. Las plantas androestériles pueden utilizarse como parentales femeninos en los programas de mejora encaminados a la obtención de híbridos. Los frutos partenocárpicos presentan características de calidad interesantes respecto a los frutos con semillas. Entre estas características destacan: mejor sabor, mayor contenido en sólidos solubles y menor acidez (Lukyanenko *et al.*, 1991). Además, los frutos de tomate sin semillas serían de interés para las industrias agroalimentarias dedicadas a la preparación de zumos, purés, salsas o sopas, donde es necesario eliminar las semillas por tamizado de las pastas antes de su procesado.

En nuestro laboratorio se han desarrollado herramientas biotecnológicas destinadas a la obtención de plantas androestériles utilizando la región promotora del gen *PsEND1* de guisante, que dirige la expresión de la ribonucleasa barnasa específicamente a los tejidos estructurales de las anteras para producir su ablación genética.

Este sistema ha permitido la obtención de plantas androestériles en diversas especies, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum* (cv. Micro-Tom) y *Kalanchoe blossfeldiana* (Roque *et al.*, 2007; García-Sogo *et al.*, 2010). En el caso particular del cultivar ornamental de tomate Micro-Tom se observó que las plantas androestériles obtenidas desarrollan frutos partenocárpicos (Roque *et al.*, 2007).

En este contexto nos propusimos generar plantas androestériles de cultivares de interés agronómico-comercial de tomate (p73 y Moneymaker) capaces de producir frutos partenocárpicos de manera similar a lo ocurrido con el cv. Micro-Tom. Además pretendíamos estudiar diversas características físicas y del fruto procesado que determinarán la calidad de los frutos partenocárpicos.

Por último, hemos estudiado las bases genético-moleculares de la partenocarpia asociada a androesterilidad temprana de las plantas *PsEND1::barnasa*.

1. Androesterilidad en plantas transgénicas *PsEND1::barnasa*

Las plantas transgénicas de tomate *PsEND1::barnasa* generadas en este trabajo son androestériles y, la mayoría de ellas no producen granos de polen viables. Las flores de los genotipos silvestres y *PsEND1::barnasa* desarrollaron los órganos característicos de la flor de tomate, excepto en el caso de las anteras. En los genotipos silvestres las anteras presentaban simetría bilateral y se unían unas a otras mediante un conjunto de tricomas abundantes y gruesos formando un cono estaminal alrededor del estilo (Brukhin *et al.*, 2003). Las anteras de plantas de los genotipos transgénicos del cv. Micro-Tom presentaban diferentes grados de malformación (Roque *et al.*, 2007). Así pues, se observaron genotipos transgénicos con anteras muy parecidas a las silvestres (fenotipo leve); otros que mostraron una ligera reducción de su tamaño y una pequeña separación entre ellos (fenotipo medio) y, otros que mostraban anteras atrofiadas que dejaban el estilo al descubierto (fenotipo severo). Las anteras de las plantas *PsEND1::barnasa* de tomate cv.p73 y cv. Moneymaker mostraron un fenotipo severo de malformación, con pérdida de la simetría bilateral y tricomas escasos y finos incapaces de unir las anteras entre sí, impidiéndose de esta manera la formación del cono estaminal y dejando el estilo al descubierto.

La ingeniería genética se ha utilizado previamente para generar plantas androestériles en tabaco y colza (Mariani *et al.*, 1990), trigo (De Block *et al.*, 1997) y col (Lee *et al.*, 2003). El sistema usado para producir androesterilidad en estos casos se basa en el uso de promotores de genes implicados en el desarrollo de la antera que dirigen la expresión de genes citotóxicos al *tapetum*, tejido que nutre al polen en el desarrollo de los sacos polínicos de la antera. El primer sistema utilizado para producir androesterilidad utilizó el promotor *TA29* de tabaco, específico de *tapetum*, para dirigir la expresión de dos RNAsas (RNasa T1 y barnasa) a las anteras de plantas de tabaco y colza (Mariani *et al.*, 1990). Se han usado también otros promotores de genes específicos de *tapetum* de arroz (*pE1*, *pT72*) y de maíz (*pca55*), para dirigir la expresión del gen *barnasa* a las anteras de plantas de trigo (De Block *et al.*, 1997). Además, se han generado plantas androestériles de col fusionando el promotor *BcA9* (promotor específico de *tapetum*) al gen citotóxico *DTA* (Lee *et al.*, 2003). Con la utilización de estos promotores no se ha conseguido una población de plantas androestériles al 100% ya que se activan en etapas tardías del desarrollo de la antera cuando el polen ya está parcialmente desarrollado, de manera que el tejido que sufre ablación (*tapetum*) ya no es estrictamente imprescindible para la correcta maduración del polen. En consecuencia, si estas plantas se utilizan en la obtención de híbridos se obtiene una población mixta de semillas híbridas y no híbridas.

El promotor *PsEND1* de guisante es una buena alternativa a dichos promotores ya que se activa en estadios muy tempranos del desarrollo, cuando se inicia la diferenciación de los primordios estaminales. En esta fase temprana la barnasa impide el desarrollo correcto de la antera destruyendo las líneas celulares que darán lugar a los tejidos que conforman los sacos polínicos. Los tejidos donde se expresa *PsEND1* proporcionan el soporte y la estructura a la antera siendo necesarios para producir polen (Gómez *et al.*, 2004). Además, el promotor *PsEND1* es muy versátil, ya que ha permitido obtener, hasta el momento, plantas androestériles de manera eficiente en especies muy diversas como *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum* y *Kalanchoe blossfeldiana* (Roque *et al.*, 2007; García-Sogo *et al.*, 2010).

2. La ablación temprana de las anteras en plantas transgénicas de tomate *PsEND1::barnasa* provoca el desarrollo de frutos partenocárpicos

La partenocarpia es una vía alternativa al cuajado y desarrollo normal del ovario para dar lugar a la formación de un fruto sin semillas. La partenocarpia puede ocurrir en ausencia de la polinización y/o fecundación; este hecho constituye una gran ventaja puesto que, la maduración del polen y la fecundación se ve afectada por condiciones ambientales tales como luz, temperatura y humedad relativa (George *et al.*, 1984). La polinización de las flores no sucede si las temperaturas nocturnas caen por debajo de los 13°C y las diurnas suben por encima de 38°C durante 5 horas. Cuando las temperaturas se encuentran fuera del intervalo 13°C-38°C no se llega a producir la fecundación, como consecuencia del insuficiente y/o incorrecto desarrollo del polen.

El desarrollo de los ovarios en las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* comienza antes que el de las plantas silvestres. Los ovarios transgénicos de flores de 5-6 días antes de la antesis (estadio 1) alcanzan un tamaño mayor que los de las flores silvestres en el mismo estadio de desarrollo. Un efecto similar se observa en mutantes *pat*, donde el crecimiento del ovario comienza precozmente, en estadio de pre-antesis (Mazzucato *et al.*, 1998). El desarrollo del ovario *PsEND1::barnasa* desemboca en la formación de frutos sin semillas y, por tanto, partenocárpicos. Los frutos partenocárpicos de plantas *PsEND1::barnasa* presentan una forma exterior similar a la de los frutos silvestres, algunos de los genotipos presentan frutos con un tamaño similar a los silvestres, aunque la mayoría de ellos presentan un tamaño ligeramente inferior. El tejido locular presente en el interior de los frutos carece de semillas. Cuando las flores de las plantas androestériles se polinizan manualmente con polen de las anteras de plantas silvestres, se obtienen frutos que alcanzan un tamaño

normal y que tienen semillas similares, en número y morfología, a las producidas por las plantas silvestres.

El cuajado del fruto de tomate se puede inducir artificialmente mediante la aplicación de hormonas, siendo más eficiente por auxinas que por giberelinas (revisión de Abad y Monteiro, 1989; Koshioka *et al.*, 1994). Los frutos inducidos por tratamientos hormonales presentan con frecuencia malformaciones así como características asociadas a mala calidad (Abad y Monteiro, 1989). Los frutos inducidos por GA₃ son más pequeños que los frutos polinizados, presentan cavidades locales vacías con un escaso desarrollo del tejido locular y, los óvulos no fecundados degeneran (Serrani *et al.*, 2007a). La aplicación de auxinas induce la formación de frutos con un mayor tamaño que los polinizados, presentan un tejido locular esponjoso e insípido (Chamarro, 1995), en el que se forman pseudoembriones (Asahira *et al.*, 1967; Kataoka *et al.*, 2003; Serrani *et al.*, 2007a). Sin embargo, se ha observado que la aplicación conjunta de ambas hormonas en dosis adecuadas, puede hacer que la morfología del fruto sea similar a la de uno polinizado (Serrani, 2008), lo cual sugiere una interacción entre ellas durante el crecimiento y desarrollo del fruto (Serrani *et al.*, 2007a).

La fructificación y el crecimiento de ovarios silvestres y *PsEND1::barnasa* se bloqueó con la aplicación de paclobutrazol (PCB), inhibidor de la biosíntesis de GAs, efecto que fue totalmente revertido con la aplicación de GA₃. Estos resultados indican que la fructificación y el crecimiento partenocárpico de los frutos *PsEND1::barnasa* depende de la biosíntesis de GAs, sugiriendo que en los ovarios de estos genotipos existe un nivel de GAs suficiente para inducir el cuajado y desarrollo partenocárpico del fruto en ausencia de polinización.

Se han identificado diversos cultivares de tomate que producen frutos partenocárpicos debido a mutaciones en los genes *pat*, *pat-2*, *pat-3/pat-4* (Soressi y Salami, 1975; Pecaut y Philouze, 1978; Maisonneuve, 1978; Nuez *et al.*, 1986; Philouze, 1989; Vardy *et al.*, 1989). El mutante *pat*, además de producir frutos partenocárpicos, exhibe un desarrollo anormal de las flores, un crecimiento prematuro del ovario, un reducido número de óvulos viables y defectos en las anteras (Mazzucato *et al.*, 1998).

Las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* generadas en este trabajo muestran similitudes con el mutante partenocárpico clásico de tomate *pat* (Soressi y Salami, 1975). La mutación *pat* afecta a la identidad y el desarrollo de los órganos florales (anteras carpeloides). Aunque el gen todavía no se ha clonado, esta mutación fue tentativamente adscrita a un gen homeótico con efecto pleiotrópico tardío de partenocarpia (Mazzucato *et al.*, 1998). Se ha descrito que en el mutante *pat* la partenocarpia podría ser un defecto inducido por las malformaciones en las anteras y

los óvulos (Mazzucato *et al.*, 1999), sugiriéndose que la interferencia en el desarrollo de las anteras conduce al crecimiento autónomo del ovario de tomate.

La asociación de transformaciones homeóticas con el desarrollo de frutos partenocárpicos se ha observado en plantas transgénicas de tomate que expresan construcciones antisentido de genes homeóticos de esta especie. Así pues, la expresión en antisentido del gen *TM8* de tomate, homólogo a los genes *SEP* de *Arabidopsis thaliana*, además de producir alteraciones morfológicas, cambios de identidad en los órganos florales, esterilidad masculina y femenina, provocó el desarrollo de frutos partenocárpicos (Lifschitz *et al.*, 1993). Asimismo, el silenciamiento del gen *TM29*, con homología a los genes *SEP* de *Arabidopsis thaliana*, provoca alteraciones de los estambres y ovarios y, además se asocia a la producción de frutos partenocárpicos y a la reversión floral (Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002). La caracterización del mutante de tomate *stamenless* muestra que las conversiones homeóticas que presenta son similares a las que produce la mutación de los genes de clase B en *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*. Este mutante tiene como principales características la ausencia de estambres y la producción de frutos carentes de semillas (Gómez *et al.*, 1999). La asociación de transformaciones homeóticas con el desarrollo de frutos partenocárpicos no sólo se ha observado en tomate; así pues, la mutación del gen de manzano, *MdPI*, homólogo al gen *PI* de *Arabidopsis thaliana*, provocó la transformación de pétalos en sépalos y de estambres en carpelos así como la producción de frutos partenocárpicos (Yao *et al.*, 2001). El hecho de que en las flores *PsEND1::barnasa* el ovario se desarrolle partenocárpicamente, hace pensar que la partenocarpia que acompaña a las mutaciones homeóticas podría deberse a las alteraciones que estas mutaciones causan en el desarrollo de las anteras y no al control directo de estos genes sobre el desarrollo del ovario. En todos los casos citados anteriormente, la formación de frutos partenocárpicos está asociada a malformaciones de los estambres y a esterilidad masculina. El fenotipo de las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa*, también estériles masculinas y partenocárpicas, apoya la idea de que, las anteras podrían generar una señal represora hacia el ovario inhibiendo su tendencia natural a crecer como fruto.

Sin embargo, la emasculación de las anteras de plantas silvestres de tomate sin posterior polinización manual no da lugar en ningún caso a frutos partenocárpicos. Posiblemente porque la emasculación sólo se puede llevar a cabo, en la práctica, cuando las anteras han alcanzado un estadio de desarrollo en el que están formadas todas sus células y tejidos especializados. Además, la emasculación es un factor externo que ocurre a espaldas de las señales internas de la planta, que ha seguido su pauta de desarrollo normal: utilizar las vías que la conducen a la polinización y

fecundación para el desarrollo de los frutos y las semillas. La represión del crecimiento autónomo del ovario por las anteras sólo tiene lugar en estadios tempranos del desarrollo. En estadios posteriores de desarrollo, el ovario adquiriría la estrategia de no desarrollarse a menos que reciba un estímulo positivo por parte de la polinización. Esta regulación del desarrollo del ovario por los estambres estaría ausente en el caso de las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa*, las cuales muestran cuajado del fruto en ausencia de polinización.

3. La producción de los genotipos *PsEND1::barnasa* es similar a la de los genotipos silvestres

El peso total de frutos por planta estima el rendimiento de la planta. El rendimiento puede dividirse, principalmente, en dos componentes: el número de frutos por planta y el peso promedio del fruto. Para obtener el máximo rendimiento no debe haber factores limitantes de ninguno de los componentes (Casanova, 1991). Nuestros resultados indicaron que, en general, el rendimiento de las plantas de los genotipos *PsEND1::barnasa* en los cultivares Micro-Tom y Moneymaker fue similar al de las plantas de sus respectivos genotipos silvestres. Este hecho se debe a que, aunque el peso de los frutos transgénicos es menor que el de los frutos silvestres, en los genotipos transgénicos el número de frutos producidos por planta es mayor que los producidos en las plantas silvestres. En el cv. p73 el rendimiento de los genotipos transgénicos se redujo respecto a los genotipos silvestres. Esto se debe a una fuerte reducción del peso medio de los frutos transgénicos de este cultivar puesto que, el número de frutos obtenidos por planta fue mayor en los genotipos transgénicos que en el silvestre. El peso medio y el tamaño del fruto se redujo en la mayoría de los genotipos transgénicos individuales *PsEND1::barnasa*, pertenecientes a los tres cultivares estudiados. Únicamente un genotipo del cv. Micro-Tom (MT TR 1d) y cuatro genotipos del cv. Moneymaker (MMK TR 44.2, MMK TR 44.1, MMK TR 67.1 y MMK TR 26.1) no mostraron reducción de peso medio del fruto al compararlos con los frutos de los genotipos silvestres. Diversos autores han descrito que el peso medio y el tamaño del fruto están correlacionados positivamente con el número de semillas (Varga y Bruinsma, 1986; Groot *et al.*, 1987). Además se sabe que el peso medio del fruto también depende del número de lóculos y del peso de cada uno de ellos (MacArthur y Butler, 1938; Lippman y Tanksley, 2001). En nuestro análisis no se han encontrado diferencias significativas respecto al número de lóculos y, aunque no se ha evaluado el peso de cada uno de ellos, sí que se ha visto que los frutos transgénicos no presentan semillas. Parece probable que las diferencias de peso observadas entre los frutos de los genotipos transgénicos y silvestres sea debida al peso de los lóculos de los frutos.

Otro aspecto importante a nivel comercial es la homogeneidad en el calibre de los frutos de un genotipo determinado, de tal manera que lo deseable es obtener frutos lo más homogéneos posibles. En este sentido, los genotipos transgénicos pertenecientes al cultivar Moneymaker han producido frutos con calibres más homogéneos que los silvestres.

En general, el número total de frutos producidos por planta aumentó en los genotipos transgénicos de los tres cultivares estudiados. La excepción a este hecho la constituyeron los cuatro genotipos del cv. Moneymaker que presentaron un peso medio similar a los silvestres, en los que el número de frutos producidos por planta fue similar al mostrado por los genotipos silvestres. El aumento del número de frutos producidos por planta observados en los genotipos transgénicos varió dependiendo del cultivar siendo mayor cuanto menor es el peso medio de los frutos del cultivar.

El aumento del número de frutos por planta tiene su origen en el aumento del número de inflorescencias por planta, del número de flores por inflorescencia y, del aumento del porcentaje de frutos cuajados. Los genotipos transgénicos del cv. p73 presentaron un número de inflorescencias por planta y un número de flores por inflorescencia similar a los genotipos silvestres, esto indica que, probablemente el aumento de frutos por planta sea debido a un mayor porcentaje de frutos cuajados en éstos. En general, en los genotipos transgénicos del cv. Moneymaker, el aumento de frutos por planta parece deberse al aumento del número de inflorescencias por planta y de flores por inflorescencia. El incremento de flores en los genotipos *PsEND1::barnasa* podría explicarse mediante la hipótesis propuesta por Hensel *et al.*, 1994. Según estos autores, el desarrollo normal de los frutos controla la capacidad de los meristemos inflorescentes de producir flores adicionales. Los frutos o las semillas producirían una señal química responsable de la represión de los meristemos. En nuestro caso, la actividad de los meristemos de las plantas androestériles *PsEND1::barnasa* no estaría reprimida por ningún tipo de señalización procedente de las semillas del fruto. Por este motivo, las inflorescencias de estas plantas continuarían con un crecimiento indeterminado produciendo más flores que los genotipos silvestres. Resultados similares se han obtenido en *Arabidopsis*; se ha visto que plantas androestériles obtenidas mediante transformación con la construcción *PsEND1::barnasa* producen mayor número de ramas y, consecuentemente mayor producción de flores (Beltrán *et al.*, 2007).

4. Los frutos de las plantas *PsEND1::barnasa* presentan mayor índice de sabor que los frutos silvestres

En la valoración de la calidad organoléptica de los frutos, el sabor es el aspecto que tiene mayor impacto en la percepción de ésta por el consumidor (Roselló y Nuez, 2006). Diversos autores asocian mejor sabor a mayor contenido en azúcares y ácidos orgánicos, estimándose el índice de sabor como la relación existente entre °Brix/acidez titulable (Bisogni *et al.*, 1976; Baldwin *et al.*, 1998).

Los genotipos *PsEND1::barnasa* han mostrado mayor contenido en °Brix que los silvestres; el incremento mayor se observó en el cv. Micro-Tom, cuyos genotipos transgénicos incrementaron su contenido en °Brix entre un 31,74% y un 56,51% mientras que, la acidez titulable se redujo entre un 5% y un 10%. En los genotipos *PsEND1::barnasa* del cv. p73 los valores de °Brix se incrementaron entre un 14,94% y un 47,69% mientras que la acidez titulable se redujo entre un 7,41% y un 20,37%. En los genotipos *PsEND1::barnasa* del cv. Moneymaker el contenido en °Brix se incrementó entre un 13,53% y un 53,62% y la acidez se redujo entre un 14% y un 60% respecto al genotipo silvestre.

Los análisis de metabolitos primarios realizados en los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 han mostrado que, en ambos, el contenido en sacarosa es el doble que en el genotipo silvestre. Además, en el genotipo MMK TR 59.1 también hemos detectado niveles superiores de otros azúcares como glucosa, fructosa, galactosa y myo-inositol.

También se han identificado ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el ácido málico, que son los ácidos predominantes en el fruto maduro del tomate. Los resultados obtenidos muestran que, en el genotipo MMK TR 39.1, el contenido de ácido cítrico es mayor que en el genotipo silvestre mientras que, el contenido de ácido málico fue menor en el genotipo transgénico. Estos resultados parecen indicar que la reducción de la acidez titulable en este genotipo respecto al silvestre podría ser debida, en parte, a la reducción del contenido en ácido málico. En el genotipo MMK TR 59.1, no se han observado diferencias significativas en el contenido en ácido cítrico y ácido málico respecto al genotipo silvestre. Por tanto, la reducción de la acidez titulable observada en este genotipo frente al silvestre podría deberse a otros ácidos minoritarios en el fruto maduro del tomate.

En nuestros análisis, prácticamente la totalidad de los genotipos *PsEND1::barnasa* de los tres cultivares evaluados presentaron un índice de sabor superior al de los

genotipos silvestres. En el cv. Micro-Tom, los genotipos transgénicos mostraron índices de sabor comprendidos entre 12 y 15, mientras que, el genotipo silvestre presentó un índice de sabor de 9. En el cv. p73, el índice de sabor de los genotipos transgénicos osciló, aproximadamente, entre 11 y 16, mientras que, el genotipo silvestre presentó un índice de sabor de 8,5. En el cv. Moneymaker, los índices de sabor en los genotipos transgénicos oscilaron entre 11 y 27 y, en el genotipo transgénico el índice de sabor fue de 8.

Kader *et al.*, 1977 y Mencarelli y Saltveit, 1988, describieron que los frutos de tomate se consideran sabrosos cuando la relación entre $^{\circ}\text{Brix}/\text{acidez titulable}$ es superior a 10. En la práctica, un valor alto de la relación $^{\circ}\text{Brix}/\text{acidez titulable}$ indica una excelente combinación azúcar y ácido correlacionándose con sabor suave mientras que, valores bajos se correlacionan con sabor ácido (Scott y Walls, 1947). Los frutos *PsEND1::barnasa* presentaron un índice de sabor superior a 10, lo que indica que, en principio, estos frutos son más sabrosos y su sabor más suave que los frutos silvestres, cuyo índice de sabor fue inferior a 10.

5. Los frutos partenocárpicos de plantas *PsEND1::barnasa* muestran algunas modificaciones en el color

Los resultados obtenidos en el análisis de color indican que, los frutos de los genotipos transgénicos *PsEND1::barnasa* del cultivar Micro-Tom presentaron tonalidades más rojas y oscuras que los silvestres. Los valores de los parámetros a^* y a^*/b^* fueron mayores que en el silvestre, mientras que, el parámetro L^* alcanzó valores menores en los frutos transgénicos. El cociente a^*/b^* es elevado en los genotipos *PsEND1::barnasa* como consecuencia de los valores elevados de a^* (componente que contribuye al color rojo) y bajos de b^* (componente que contribuye al color amarillo). Estos resultados sugieren que, los frutos *PsEND1::barnasa* del cv. Micro-Tom podrían contener mayor cantidad de licopeno, ya que, diversos estudios han mostrado que a^* y a^*/b^* están correlacionados positivamente con el contenido en licopeno en algunos cultivares de tomate (Arias *et al.*, 2000). En el cultivar p73 los frutos transgénicos *PsEND1::barnasa* presentan tonalidades rojizas similares a los frutos silvestres pero presentan colores menos intensos, menos vivaces, como consecuencia de los valores menores de croma mostrados por los mismos.

En el cultivar Moneymaker, el 70% de los genotipos *PsEND1::barnasa* presentaron frutos con colores diferentes a los silvestres, distinguiéndose dos grupos. Un primer grupo está constituido por los genotipos MMK 44.1, MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1, cuyo cociente a^*/b^* es inferior que en el genotipo silvestre debido a los valores

elevados del parámetro b^* . En los frutos de estos genotipos, la proporción de tonalidades amarillas es mayor que las tonalidades rojas y, por tanto presentan un color más anaranjado que los silvestres. Arias *et al.*, 2000 correlacionan positivamente valores elevados de b^* con la síntesis de β -caroteno; por tanto, estos tres genotipos transgénicos podrían tener mayor cantidad de este carotenoide. El segundo grupo está formado por los genotipos MMK TR 38.1, MMK TR 48.1, MMK TR 44.2 y MMK TR 67.1. Los frutos de estos genotipos transgénicos han presentado, en general, valores de a^* y a^*/b^* superiores a los frutos silvestres. Los frutos de estos cuatro genotipos transgénicos tendrían tonalidades más rojas que los frutos silvestres. De la misma manera que ocurre en el cultivar Micro-Tom, los frutos de estos genotipos podrían tener mayor contenido en licopeno, puesto que los valores elevados de a^* y a^*/b^* están asociados a niveles elevados de este pigmento carotenoide (Arias *et al.*, 2000).

6. Los frutos de los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 presentan cambios importantes en el perfil de volátiles y metabolitos primarios

La caracterización de los compuestos volátiles se ha realizado mediante microextracción en fase sólida en espacio de cabeza y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS). En nuestro análisis este método ha sido satisfactorio puesto que se ha obtenido un amplio perfil aromático de los frutos analizados. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la existencia de una gran complejidad en la composición de la fracción volátil del tomate, detectándose 53 compuestos diferentes en los frutos de tomate en el estadio rojo maduro.

Los genotipos más extremos, es decir, cuyo contenido en compuestos volátiles difiere más del genotipo silvestre, son los genotipos MMK TR 39.1, MMK TR 59.1, MMK TR 38.1 y MMK TR 26.1. En estos cuatro genotipos los niveles de compuestos volátiles derivados de carotenoides y de lípidos fueron mayores que en el silvestre. El incremento de compuestos derivados de carotenoides es de gran interés en la mejora de la calidad organoléptica del fruto de tomate. Estos compuestos volátiles se han asociado a notas florales y frutales del aroma (Marais, 1983; Knudsen *et al.*, 1993; Krumbein y Auerswald, 1998; Burdock, 2002; Lewinsohn *et al.*, 2005b), por lo que, nuestros frutos transgénicos presentarían mejor sabor y aroma que los silvestres. El incremento de carotenoides con alto poder antioxidante, como licopeno y β -caroteno en el fruto de tomate, es un aspecto muy importante desde el punto de vista nutricional, ya que, el licopeno tiene importantes propiedades dietéticas, puede ayudar a prevenir diversos tipos de cánceres y a reducir el riesgo de ataques al corazón

(Abushita *et al.*, 1997). El β -caroteno tiene actividad de provitamina A y su deficiencia puede causar xerolftalmia, ceguera y muerte prematura (Mayne, 1996).

Los compuestos derivados de lípidos están asociados a notas frescas, notas frutales y notas “verdes” (Baldwin *et al.*, 1998; Baldwin *et al.*, 2004) y su incremento podría ser beneficioso para mejorar el flavor global del fruto de tomate.

Los compuestos fenólicos fueron, en general, más abundantes en los genotipos transgénicos que en el silvestre, a excepción de metilsalicilato y etilsalicilato. En la bibliografía se ha descrito que los compuestos fenólicos contribuyen con notas florales y frutales al aroma (Marais, 1983; Knudsen *et al.*, 1993; Krumbein y Auerswald, 1998; Burdock, 2002; Lewinsohn *et al.*, 2005b) y potencian la sensación de dulzor del fruto (Baldwin *et al.*, 2004). El metilsalicilato y etilsalicilato están asociados a estadios inmaduros o verdes del fruto (menos apreciados organolépticamente en tomate); por tanto, esta disminución sería interesante para contribuir positivamente al aroma del fruto de tomate. Cabe mencionar los elevados niveles detectados de 1-nitro-2-feniletano en el genotipo transgénico MMK TR 39.1 respecto al genotipo silvestre. Este compuesto nitrogenado es inusual en el tomate, no se encuentran en otras frutas o verduras, pero sí en ciertas flores.

En lo que respecta a los compuestos derivados de la leucina e isoleucina muchos de ellos presentaron niveles inferiores en los genotipos transgénicos al compararlos con el silvestre. Se trata de compuestos que aportan sensación de estancamiento o de ambiente viciado, de acre o picante y de alcohol (Tandon *et al.*, 2000), por lo que una reducción del contenido de los mismos podría resultar muy interesante. Como excepciones destacan compuestos como (E)-2-metil-2-butenal y 3-metilbutanol, que se encontraron en niveles superiores en algunos genotipos transgénicos. La posibilidad de aumentar la concentración de 3-metilbutanol, compuesto asociado a notas frescas en estadios tempranos del desarrollo del fruto, podría ser especialmente interesante para aumentar determinadas características, como la frescura de los tomates verdes en los tomates maduros.

Los resultados obtenidos en el análisis de compuestos volátiles indican que los frutos transgénicos podrían tener un aroma más floral, afrutado y fresco que los de los frutos de los genotipos silvestres. Además, presentan un incremento de determinados compuestos volátiles que potencian la sensación de dulzor del fruto y una disminución de compuestos que aportan sensación de estancamiento, acre y alcohol. El incremento de compuestos volátiles derivados de carotenoides junto con el incremento de tonalidades rojas y anaranjadas en los frutos transgénicos podría estar indicando que en los frutos transgénicos existe mayor contenido de pigmentos carotenoides potencialmente beneficiosos para la salud.

La caracterización de metabolitos primarios mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permitió identificar un total de 26 compuestos entre azúcares, ácidos y aminoácidos a partir del pericarpo del fruto pelado de tomate. Los resultados obtenidos de la comparación de los genotipos transgénicos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 respecto al genotipo silvestre muestran que los frutos de estos genotipos transgénicos presentaron niveles significativamente superiores de casi todos los aminoácidos identificados. El incremento de los niveles de aminoácidos en los frutos transgénicos es importante porque los aminoácidos determinan diversos aspectos del sabor del fruto y contribuyen a la mejora del valor nutritivo del mismo.

Los aminoácidos aromáticos libres (triptófano y fenilalanina) constituyen los principales precursores de compuestos volátiles que contribuyen positivamente al flavor del fruto de tomate durante el proceso de maduración (Goff y Klee, 2006). El incremento de fenilalanina observado en el genotipo MMK TR 39.1 respecto al genotipo silvestre podría ser el responsable del aumento observado de 1-nitro-2-feniletano, ya que se ha descrito que este compuesto puede formarse en el fruto a partir de fenilalanina mediante algún sistema enzimático (Buttery, 1993).

Diversos autores han descrito que el ácido glutámico y el ácido aspártico tienen un efecto global en el sabor del tomate (Fuke y Shimizu, 1993) y son los responsables de aportar al fruto el sabor “umami” (Oruna-Concha *et al.*, 2007). Este sabor es independiente de los cuatro sabores tradicionales; se describe como “sabroso, semejante al caldo o sabor a carne” y juega un papel importante en la aceptación de muchos alimentos por parte del consumidor. Los resultados de análisis han mostrado que los genotipos transgénicos presentan mayores niveles de ácido aspártico y ácido glutámico que el genotipo silvestre y, en consecuencia los frutos transgénicos tendrían un sabor “umami” más acentuado.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido particularmente interesante que se encuentra en muchas frutas y verduras. En estudios realizados con animales (Takahashi *et al.*, 1955) y con humanos (Elliot y Hobbiger, 1959) se ha descrito que contribuye a disminuir la presión sanguínea. En los frutos transgénicos hemos observado que los niveles de GABA son superiores que en el genotipo silvestre, lo que indicaría que los frutos transgénicos podrían tener propiedades hipotensoras.

7. La formación de frutos partenocárpicos *PsEND1::barnasa* está asociada a importantes cambios transcripcionales en estadios tempranos del desarrollo del ovario

Se han realizado diversos estudios de expresión génica global enfocados a estudiar el proceso de maduración en tomate (Giovannoni, 2004; Fei *et al.*, 2004; Lemaire-Chamley *et al.*, 2005; Faurobert *et al.*, 2007). Sin embargo, el desarrollo temprano de este fruto ha sido, hasta el momento, menos estudiado (Pascual *et al.*, 2007; Vrienzen *et al.*, 2008). El desarrollo del ovario se detiene antes de la antesis a la espera de que tenga lugar la polinización y la fecundación, tras las que el fruto comienza a formarse. En la formación de frutos partenocárpicos existe un desacoplamiento entre la polinización, la fecundación y el desarrollo del fruto (Gorguet *et al.*, 2005). Con objeto de identificar genes implicados en el desarrollo partenocárpico de los frutos *PsEND1::barnasa* en ausencia de polinización, hemos analizado los cambios globales a nivel de transcripción, en 5 estadios de desarrollo y dos genotipos del cv. Micro-Tom de tomate (*PsEND1::barnasa* y silvestre). La herramienta utilizada para este estudio ha sido la micromatriz TOM2 generadas en la Universidad de Cornell (<http://www.sgn.cornell.edu>).

Los estudios de la expresión génica global presentados en este trabajo indican que, el mayor número de cambios transcripcionales entre los ovarios *PsEND1::barnasa* y los silvestres, tienen lugar en los estadios 1 y 4 de desarrollo, con 1.940 y 2.295 genes, respectivamente. En estos dos estadios de desarrollo, aproximadamente el 32% de los cambios transcripcionales observados corresponden a la categoría de metabolismo mientras que el 30% corresponden a cambios asociados a procesos de regulación. Dentro del metabolismo, la fotosíntesis, el metabolismo de azúcares, la biosíntesis y modificación de la pared celular y el metabolismo de lípidos, son las categorías funcionales que han mostrado mayor número de genes expresados diferencialmente. En lo que respecta a los mecanismos de regulación, los principales cambios corresponden a factores de transcripción y cambios en la modificación y degradación de proteínas.

En el estadio 1 de desarrollo hemos observado una represión global de los unigenes relacionados con fotosíntesis y con la degradación de almidón mientras que el catabolismo de la sacarosa se encuentra inducido. De manera inversa, en estadios más tardíos del desarrollo (estadio 4) se ha observado una inducción global de la fotosíntesis y de la biosíntesis de sacarosa que van acompañadas de una inducción de la degradación de almidón. Diversos autores han descrito que bajas concentraciones

de azúcares activan la fotosíntesis y la movilización de las reservas mientras que elevadas concentraciones de azúcares las reprimen (Rolland *et al.*, 2006). De acuerdo con estos resultados, la energía necesaria para el cuajado del fruto en estadios tempranos del desarrollo se obtendría de la degradación de sacarosa mientras que, en estadios posteriores del desarrollo, la obtendría de los fotoasimilados sintetizados en la fotosíntesis y de la conversión de almidón a sacarosa.

El 60% de los unigenes expresados diferencialmente relacionados con la biosíntesis y modificación de la pared celular mostraron represión en el estadio 1 mientras que en estadios más tardíos del desarrollo (estadio 4) en los que la división celular tiene lugar, la mayor parte de los unigenes relacionados con la biosíntesis y modificación de la pared celular mostraron inducción. El estudio de estos unigenes, entre los que destacan unigenes con homología a expansinas y a pectinmetilesterasas, puede ser de gran utilidad puesto que provocan cambios en la pared celular que están relacionados con procesos de maduración del fruto (Smith y Gross, 2000).

Entre el gran número de factores de transcripción que han mostrado expresión diferencial en los ovarios *PsEND1::barnasa* destacan *TAG1* (*Tomato Agamous 1*) y *TAGL6* (*Tomato Agamous-like 6*), pertenecientes a la familia MADS-box. La represión de *TAG1* y *TAGL6* se observa en el estadio 1 de desarrollo y continúa hasta el momento de la antesis (estadio 4). Resultados similares fueron obtenidos por Wang *et al.*, 2009, quienes describieron que líneas de tomate antisentido *IAA9*, capaces de desarrollar frutos partenocárpicos, presentan niveles bajos de expresión de *TAG1* y *TAGL6* tras la polinización y fecundación, permaneciendo bajos en las etapas tempranas de desarrollo del fruto. Además también se ha descrito que el silenciamiento de *TAG1* mediante técnicas de antisentido desencadena alteraciones en el desarrollo de la flor, convirtiendo los estambres en órganos petaloides, indeterminando el meristemo floral y produciendo frutos con pocas semillas (Pnueli *et al.*, 1994). La represión temprana de la expresión de estos genes que tiene lugar en los ovarios *PsEND1::barnasa* sugiere que en éstos el desarrollo está adelantado.

En la categoría de modificación y degradación de proteínas hemos encontrado un gran número de unigenes que han mostrado expresión diferencial a lo largo del desarrollo del ovarios *PsEND1::barnasa*. Entre ellos, destaca un grupo de unigenes con homología a proteínas quinasas y fosfatasa implicadas en la cadena de fosforilaciones/defosforilaciones de transducción de señal (Clark *et al.*, 2001; Hardie, 1999; Luan, 2003). El otro grupo que destaca es más numeroso y está constituido por unigenes implicados en la degradación de proteínas mediante el proteosoma 26S. Aproximadamente el 30% de estos unigenes presentan homología a proteínas que

forman parte del complejo SCF (Skp1/cullin/F-box) E3 ligasa y a ubiquitinas de tipo "RING-finger". En estadios tempranos de desarrollo está inducido un unigen con homología a *SLEEPY1* (*SLY1*) de *Arabidopsis thaliana*. El gen *SLEEPY1* codifica una proteína F-box que interviene en la degradación de las proteínas DELLA mediante el complejo de ubiquitinación SCF^{SLY1} de *Arabidopsis* (McGinnis *et al.*, 2003). Esto podría indicar que en estadios tempranos de desarrollo en los ovarios *PsEND1::barnasa* está activa la degradación de proteínas DELLA, desreprimiendo los genes de respuesta a GAs involucrados en diversos procesos del desarrollo de las plantas (Fleet y Sun, 2005).

El elevado número de unigenes implicados en la modificación y degradación de proteínas sugiere que el desarrollo partenocárpico de los ovarios *PsEND1::barnasa* no sólo está regulado a nivel transcripcional sino que también está fuertemente regulado a nivel post-traducciona. En plantas la degradación de proteínas mediante ubiquitinación y posterior degradación mediante el proteosoma 26S es importante en diversos procesos del desarrollo como la respuesta hormonal, fotomorfogénesis desarrollo floral y senescencia (Moon *et al.*, 2004). En la regulación hormonal, el complejo SCF degrada represores de la respuesta a hormonas como auxinas y GAs.

Los estudios de la expresión génica global presentados en este trabajo indicaron que, durante el proceso de formación del fruto partenocárpico *PsEND1::barnasa* se activan y se reprimen procesos del metabolismo y de la regulación similares a los que ocurren en el desarrollo de un fruto silvestre tras la polinización (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005; Pascual *et al.*, 2007; Vrienzen *et al.*, 2008; Martinelli *et al.*, 2009). La diferencia reside en que, mientras que el fruto silvestre requiere la polinización para la activación y represión de todos estos procesos, en el ovario transgénico la activación o represión de los mismos se lleva a cabo en estadios muy tempranos del desarrollo, anteriores al momento en el que en un ovario silvestre es polinizado.

8. Auxinas y giberelinas participan en el desarrollo partenocárpico de los frutos de plantas *PsEND1::barnasa*

Diversas hormonas vegetales y en particular auxinas y giberelinas, desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del fruto de tomate, desde la fructificación hasta la maduración. Numerosas evidencias demuestran la implicación de estas dos hormonas, por una parte, la aplicación exógena de auxinas ó giberelinas permiten inducir partenocarpia en tomate (Gustafson 1936; Bünger-Kibler y Bangerth, 1982/83, Alabadí *et al.*, 1996; Fos *et al.*, 2000; Fos *et al.*, 2001). De manera inversa, la aplicación de inhibidores de la biosíntesis de GAs en frutos polinizados inhibe su

desarrollo, efecto revertido por la aplicación de GA₃ (Fos *et al.*, 2000; Fos *et al.*, 2001). Además plantas transgénicas en las que se induce la síntesis de auxinas en los óvulos y la placenta conduce al desarrollo de frutos partenocárpicos en diversas especies como berenjena, tomate, fresa y frambuesa (Rotino *et al.*, 1997, Ficcadenti *et al.*, 1999, Mezzetti *et al.*, 2004). También se ha comprobado que mutantes partenocárpicos de tomate tienen un contenido mayor de auxinas y GAs que el de los genotipos silvestres (Mapelli *et al.*, 1978, Mapelli y Lombardi, 1982).

Nuestros resultados han mostrado que la formación de frutos partenocárpicos en las plantas androestériles *PsEND1::barnasa* es dependiente de GAs. Tratamientos con PCB inhiben la fructificación y pueden ser revertidos con aplicaciones de GA₃. Por este motivo hemos analizado en profundidad la expresión de genes relacionados con el metabolismo y regulación de GAs y auxinas.

Se ha analizado la expresión de todas las enzimas descritas, hasta el momento, que están implicadas en los últimos pasos de la ruta de biosíntesis de GAs en ovarios silvestres y *PsEND1::barnasa* del cv. Micro-Tom, durante el desarrollo temprano del ovario. Se han estudiado los niveles de expresión de las enzimas que intervienen en estos pasos del metabolismo de GAs porque se ha descrito que las últimas etapas de la síntesis son limitantes para la obtención de GAs activas. En particular destacan las enzimas GA20ox y GA3ox; las primeras son necesarias para convertir GA₁₂ y GA₅₃ en GA₉ y GA₂₀, respectivamente. Las segundas (GA3ox) intervienen en la conversión de GA₉ y GA₂₀ en GAs activas, GA₄ y GA₁, respectivamente. Estas GAs activas son inactivadas por la acción de otro grupo de enzimas, GA2ox, que provocan una β-hidroxilación en la posición del C-2 de GA₄ y GA₁ para generar las GAs inactivas GA₃₄ y GA₈, respectivamente (Hedden y Phillips, 2000a).

En tomate existen 3 GA20ox (*SIGA20ox1*, *SIGA20ox2*, *SIGA20ox3*) y 2 GA3ox (*SIGA3ox1* y *SIGA3ox2*). Las principales diferencias de expresión se observaron en el estadio 1 de desarrollo del ovario. Los ovarios *PsEND1::barnasa* presentaron mayores niveles de transcritos de los genes *SIGA20ox1* y *SIGA3ox1*. Los niveles de transcritos del gen *SIGA20ox1* fueron 2,60 veces superiores en los ovarios *PsEND1::barnasa* respecto a los silvestres; los niveles de *SIGA3ox1* fueron 2,48 veces superiores en los ovarios *PsEND1::barnasa* que en los silvestres. Estos resultados indican que, en estadios tempranos del desarrollo de los ovarios *PsEND1::barnasa*, se encuentran alterados dos pasos del metabolismo de GAs, sugiriendo la importancia de la actividad *SIGA20ox1* y *SIGA3ox1* en el desarrollo partenocárpico de los mismos. El incremento del nivel de transcritos de estos dos genes podría ser una de las causas de la inducción del cuajado y desarrollo del fruto en ausencia de polinización en los ovarios *PsEND1::barnasa*. Estos resultados son similares a los obtenidos por diversos autores

en ovarios polinizados de tomate. Rebers *et al.*, 1999 y Vriezen *et al.*, 2008 observaron que la polinización induce la expresión de los genes de biosíntesis de GAs, *SIGA20ox1* y *SIGA3ox1* en los ovarios, sugiriendo que esta inducción es la responsable de que se produzca un aumento de la biosíntesis de GAs.

En lo que respecta a la degradación de GAs activas, se han descrito 5 genes que codifican enzimas GA2ox (*SIGA2ox1*, *SIGA2ox2*, *SIGA2ox3*, *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5*). Los genes que presentaron cambios más significativos en nuestro análisis fueron *SIGA2ox2* y *SIGA2ox4*. En ovarios *PsEND1::barnasa* los niveles de transcritos de estos genes fueron, respectivamente, 4,44 y 1,55 veces superiores que en los ovarios silvestres. Los resultados anteriores sugieren que en estadios tempranos del desarrollo del ovario *PsEND1::barnasa* no sólo se encuentra inducida la biosíntesis de GAs activas sino que también la inactivación de GAs, mediada por *SIGA2ox2* y *SIGA2ox4*, está activada.

El aumento de los niveles de expresión de los genes de biosíntesis *SIGA20ox1* y *SIGA3ox1*, y de degradación, *SIGA2ox2* y *SIGA2ox4*, en el estadio 1 en los ovarios *PsEND1::barnasa* es similar al obtenido por Frigerio *et al.*, 2006; Dorcey *et al.*, 2009. Estos autores describen que en plantas de *Arabidopsis* en las que se induce la fructificación realizando un tratamiento con auxinas, se incrementa la expresión de genes, tanto de biosíntesis como de degradación de GAs. La expresión de estos genes se localiza en tejidos diferentes. Parece que el mecanismo de regulación del metabolismo de GAs por auxinas es diferente en cada tejido. En nuestro análisis hemos utilizado ovarios completos de las flores *PsEND1::barnasa*, observando que los niveles de transcritos de *SIGA20ox* y *SIGA2ox* son elevados aunque no podemos determinar dónde se expresa cada uno de ellos.

En tomate se ha descrito que la polinización incrementa los niveles de GAs en el ovario, incrementándose su biosíntesis (a través de *SICPS* y *SIGA20ox*, y no de *SIGA3ox*), pero sin reducir la degradación de GAs por medio de *SIGA2ox* (Serrani *et al.*, 2007b).

Los cambios en los niveles de transcritos de los genes *SIGA20ox1*, *SIGA3ox1*, *SIGA2ox2* y *SIGA2ox4* en el estadio 1 de desarrollo no han podido ser complementados con los estudios de expresión génica global llevados a cabo con micromatrices. Respecto a los genes relacionados con el metabolismo de GAs, sólo hemos encontrado expresados diferencialmente unigenes con homología a *SIGA2ox2* de *Nicotiana tabacum* y a una oxidasa del ácido ent-kaurenoico, (KAO1), de *Arabidopsis thaliana*. El hecho de que en el análisis de micromatrices no encontremos más genes del metabolismo de GAs expresados diferencialmente se debe a diversos motivos. Por una parte a que, a pesar de que en la micromatriz TOM2 las giberelinas

representan el 10,44% del total de unigenes que conforman la categoría funcional “Hormonas”, los genes que codifican enzimas GA20ox, GA3ox y GA2ox, están muy poco representados en la micromatriz. Sólo hay cinco genes del metabolismo de GAs representados en ella y, por otra parte, estos genes presentan una anotación imprecisa por lo que es difícil identificar con seguridad con que miembro de cada familia de enzimas se corresponde. En el análisis transcriptómico sí que hemos observado expresión diferencial de otros tres unigenes relacionados con giberelinas, como los miembros de la familia GASA/GAST/Snakin. Los miembros de esta familia están regulados por GAs. El gen *GAST1* codifica una proteína de pared celular, de función desconocida, que se expresa en el exocarpo del fruto de tomate (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005).

Hemos analizado la expresión de diversos genes clave implicados en la señalización de auxinas: *SIIAA3*, *SIIAA9*, *SIARF7* y *SIARF8*. Las principales diferencias de expresión entre los ovarios transgénicos y silvestres las mostraron los genes *SIIAA9*, *SIARF7* en el estadio 1 de desarrollo. El nivel de transcritos de *SIIAA9* en los ovarios transgénicos se redujo un 50% respecto al nivel de transcritos del ovario silvestre, aunque, a partir del estadio 2, los niveles de transcritos son similares en el genotipo transgénico y en el silvestre. Los niveles de expresión de *SIARF7* en los ovarios *PsEND1::barnasa* se han reducido un 20% respecto a los niveles de expresión de los ovarios silvestres. El gen *SIIAA9* ha sido identificado como un represor transcripcional de la expresión génica inducida por auxinas (Wang *et al.*, 2005). Se ha podido reducir la expresión de este gen en líneas antisentido, provocando el desarrollo de frutos partenocárpicos (Wang *et al.*, 2005). Por otra parte, De Jong *et al.*, 2009, propusieron un papel de *SIARF7* como represor de la fructificación, ya que, el silenciamiento de éste en plantas transgénicas de tomate provoca la formación de frutos partenocárpicos.

La disminución de los niveles de expresión de los genes *SIIAA9* y *SIARF7* en los ovarios transgénicos *PsEND1::barnasa* coincide con la activación de la fructificación observada en los mismos.

Actualmente existen dos modelos diferentes que explicarían la función de *AtARF8* y *SIARF7* (Figura 67). El primer modelo se basa en las observaciones de Goetz *et al.*, 2007, quienes describen que ARF8 forma un complejo inhibitorio con proteínas de la familia Aux/IAA, probablemente IAA9, reprimiendo la transcripción de los genes de respuesta a auxinas. Al producirse la polinización y la fecundación se produciría un aumento de auxinas en el óvulo o en el ovario (Pandolfini *et al.*, 2007; Dorcey *et al.*, 2009) que induciría el desmantelamiento del complejo represor ARF8-Aux/IAA, y, las proteínas Aux/IAA serían rápidamente ubiquitinadas y degradadas mediante el

En el análisis de micromatrices hemos detectado expresión diferencial durante el desarrollo temprano de los ovarios *PsEND1::barnasa* de un gran número de genes relacionados con metabolismo, regulación y transporte de auxinas. Entre ellos destacan unigenes con homología a genes *GH3*, que codifican enzimas IAA amido-sintasa, cuya expresión está inducida. Se ha descrito que estas enzimas se inducen a concentraciones elevadas de auxinas y, en estudios realizados *in vitro* se ha visto que forman conjugados de tipo éster (IAA con azúcares) y de tipo amida (IAA con péptidos o aminoácidos) (Staswick *et al.*, 2005). Estos conjugados participan en el almacenamiento, transporte y compartimentalización de auxinas regulando así el nivel total de auxinas libre existente (LeClere *et al.*, 2002). También hemos identificado unigenes reprimidos con homología a genes *IAR* de *Arabidopsis thaliana* implicados en la respuesta a auxinas y unigenes con homología a los genes *PIN* y *TIR*, relacionados con el transporte de auxinas. Los genes *IAR* codifican enzimas IAA-amidohidrolasas, encargadas de actuar sobre los conjugados IAA-aminoácidos para producir IAA libre (LeClere *et al.*, 2002). El gen *TIR*, es un receptor de auxinas cuya función es facilitar la degradación del complejo AUX/IAA y eliminar sus efectos de represión sobre los genes de respuesta a auxinas. La represión de este gen conlleva estabilización del complejo AUX/IAA y el mantenimiento de sus efectos de represión (Kazan, K, 2009). Los genes *PIN* participan en el transporte polar y distribución de auxinas necesario para una gran cantidad de procesos del desarrollo en la planta. En tomate, se ha descrito que la proteína transportadora de auxinas PIN7-like podría jugar un papel fundamental en la diferenciación del tejido locular y la morfogénesis del fruto mediante el establecimiento de gradientes de auxinas en los diferentes tejidos que lo componen (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que, en este momento del desarrollo, podría existir un nivel de auxinas elevado en los ovarios *PsEND1::barnasa* ya que, se observa una inducción de los unigenes implicados en la formación de conjugados de IAA (sintetizados cuando los niveles de IAA son elevados) y represión de los unigenes implicados en la hidrólisis de los conjugados de IAA (hidrolizados cuando hay un déficit de IAA).

VI. Conclusiones



VI. CONCLUSIONES

Del conjunto de resultados presentados en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El promotor *PsEND1* de guisante dirige la expresión del gen citotóxico *barnasa* a las anteras en las plantas transgénicas de los cultivares p73 y Moneymaker de tomate. Las plantas transgénicas obtenidas son androestériles pudiendo ser útiles como parentales femeninos en los programas de mejora para la obtención de semillas híbridas de tomate.
2. La ablación temprana de las anteras en plantas *PsEND1::barnasa* da lugar a la formación de frutos partenocárpicos en todos los genotipos androestériles generados. Este resultado sugiere la existencia de una relación entre la androesterilidad temprana y el desarrollo autónomo del ovario en esta especie. La expresión del transgén *PsEND1::barnasa* podría utilizarse como herramienta biotecnológica para la obtención de frutos partenocárpicos de tomate.
3. La producción de los genotipos *PsEND1::barnasa* es similar a la de los genotipos silvestres. La diferencia reside en que, en los genotipos transgénicos la producción está constituida por frutos con menor peso y tamaño que los frutos de los genotipos silvestres pero, el número de frutos producido por planta en los genotipos transgénicos es mayor que los producidos por los genotipos silvestres.
4. Los frutos de los genotipos *PsEND1::barnasa* presentan un índice de sabor mayor que los frutos de los genotipos silvestres. Los valores elevados del índice de sabor en los frutos de los genotipos transgénicos indican que éstos presentan una buena combinación entre azúcares y ácidos que se correlaciona con un sabor suave de los mismos.
5. Se han detectado cambios de color en los frutos de los genotipos *PsEND1::barnasa* del cv. Micro-Tom y en los genotipos MMK TR 59.1, MMK TR 39.1, MMK TR 44.1, MMK TR 48.1, MMK TR 44.2, MMK TR 67.1 y MMK TR 38.1 del cv. Moneymaker.

6. Los frutos de los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 presentan cambios importantes en el perfil de compuestos volátiles. En los genotipos transgénicos se han incrementado compuestos que aportan al flavor del fruto notas florales y frutales (6-metil-5-hepten-2-ona, terpineol, geranilacetona, benzaldehído, eugenol) y frescas (1-penten-3-ona). De manera inversa, han disminuido compuestos que aportan al flavor del fruto sensación de estancamiento o de ambiente viciado (3-metil-butanal). Esta combinación de compuestos volátiles que presentan los genotipos transgénicos podría tener una repercusión positiva en la calidad organoléptica del tomate.

7. El incremento de compuestos volátiles derivados de carotenoides junto con el incremento de tonalidades anaranjadas de los frutos de los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 podrían indicar que los frutos de estos genotipos transgénicos existe un mayor contenido de pigmentos carotenoides potencialmente beneficiosos para la salud.

8. Los frutos de los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 presentan cambios importantes en metabolitos primarios como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos. En general estos genotipos transgénicos presentaron un mayor contenido de azúcares y aminoácidos que los genotipos silvestres. El contenido en ácidos orgánicos varió en función del genotipo y del ácido identificado. Los resultados del análisis de metabolitos primarios indican que los frutos de los genotipos transgénicos podrían ser más dulces y presentar un mayor valor protéico que los frutos de los genotipos silvestres.

9. El análisis transcriptómico de los ovarios *PsEND1::barnasa* y silvestres pone de manifiesto que, en estadios muy tempranos del desarrollo, se produce un elevado número de cambios transcripcionales en los ovarios transgénicos, en comparación con los producidos en el mismo estadio en los ovarios silvestres. Estos cambios son similares a los que se producen en el ovario silvestre cuando éste es polinizado. La mayor parte de estos cambios de expresión están asociados con procesos de regulación y, concretamente, con hormonas (auxinas y giberelinas) y con factores de transcripción. También se han observado cambios en la expresión de genes asociados con procesos metabólicos (fotosíntesis, pared celular y metabolismo secundario).

10. La formación de frutos partenocárpicos en las plantas androestériles *PsEND1::barnasa* depende de la síntesis de GAs, ya que tratamientos con paclobutrazol inhiben el desarrollo del ovario y este efecto es revertido con la aplicación de GA₃.

11. En estadios tempranos del desarrollo, los ovarios *PsEND1::barnasa* presentan un incremento en los niveles de transcritos de genes de biosíntesis de GAs (*SIGA20ox1* y *SIGA3ox1*) así como en los niveles de transcritos de genes del catabolismo de GAs (*SIGA2ox2* y *SIGA2ox4*). Estos resultados sugieren que en los ovarios transgénicos existe un nivel elevado de GAs capaz de inducir el cuajado y desarrollo partenocárpico del fruto en ausencia de polinización.

12. En los frutos de las plantas *PsEND1::barnasa* los niveles de expresión de los genes *SIIAA9* y *SIARF7* han disminuido respecto a los frutos silvestres en estadios de desarrollo tempranos. Estos genes podrían actuar como factores reguladores negativos en el proceso de fructificación y desarrollo del ovario en esta especie. Las auxinas estarían implicadas en la formación de frutos partenocárpicos *PsEND1::barnasa*, inducidos por androesterilidad, mediante un mecanismo similar al que ocurre en el desarrollo de los frutos inducidos mediante polinización.

VII. Bibliografía



VII. BIBLIOGRAFÍA

Abad, M.; Monteiro, A.A. 1989. The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions: a review. *Scientia Hort.* 38: 167-192.

Abushita, A.A.; Hebshi, E.A.; Dado, H.G.; Biacs, P.A. 1997. Determination of antioxidante vitamins in tomatoes. *Food Chem.* 60: 207-212.

Adalid, A.; Roselló, S.; Cebolla-Cornejo, J.; Nuez, F. 2005. Evaluation and selection of *lycopersicon* accessions for their high carotenoid and vitamina C content. XV Meeting of the EUCARPIA Tomato Working Group.

Alabadí, D.; Agüero, M.S.; Pérez-Amador, M.A.; Carbonell, J. 1996. Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries. Changes in pollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin and gibberellin. *Plant Physiol.* 112: 1237-1244.

Alba, R.; Fei, Z.; Payton, P.; Liu, Y.; Moore, S.L.; Debbie, P.; Cohn, J.; D'Ascenzo, M.; Gordon, J.S.; Rose, J.K. 2004. ESTs, cDNA microarrays and gene expresión profiling: tools for dissecting plant phisiology and development. *Planta J.* 39: 697-714.

Alba, R.; Payton, P.; Fei, Z.; Mcquinn, R.; Debbie, P.; Martin, G. B.; Tanksley, S.D.; Giovannonni, J. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell*, 17: 2954-2965.

AMITOM, 2005a. Industrial products. *Tomato News* (Fuera de serie OCT. 2005): 6-19.

Ampomah-Dwamena, C.; Morris, B. A.; Sutherland, P.; Veit, B.; Yao, J.L. 2002. Down-Regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiol.* 130: 605-617.

Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.

Arias, R.; Lee, T.C.; Logendra, L.; Janes, H. 2000. Correlation of Lycopene Measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. *J. Agric. Food. Chem*, 48: 1697-1702.

Asahira, T.; Takeda, Y.; Nishio, T.; Hirabayashi, M.; Tsuikamoto, Y. 1967. Studies on fruit development on tomato. I. Ovule development and content of diffusible auxin in synthetic auxin and gibberellin-induced parthenocarpic tomato fruits in relation to their development. *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* 28: 47-74.

Ashburner, M.; Ball, C.A.; Blake, J.A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J.M.; Davis, A.P.; Dolinski, K.; Dwight, S.S.; Eppig, J.T.; Harris, M.A.; Hill, D.P.; Issel-Tarver, L.; Kasarskis, A.; Lewis, S.; Matese, J.C.; Richardson, J.E.; Ringwald, M.; Rubin, G.M.; Sherlock, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *The Gene Ontology Consortium. Nat Genet* 25: 25-29.

Aubert, D.; Chevillard M.; Dorne, A.M.; Arlaud, G.; Herzog, M. 1998. Expression patterns of GASA genes in *Arabidopsis thaliana*: the GASA4 gene is up-regulated by gibberellins in meristemetic regions. *Plant Mol Biol.*, 36:871-883.

Auroma, O.I. 1999. Antioxidant actions of plants foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free radical Res.* 30: 419-427.

Babbit, J.K.; Powers, M.J.; Patterson, M.E. Effects of growth-regulators on cellulose, polygalacturonase, respiration, color and texture of ripening tomatoes. 1973. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 98 (1):77-81.

Bagget, J.R.; Fraizer, W.A. 1978. Oregon Cherry Tomato. *HortScience*, 13: 598.

Bagget, J.R.; Kean, D. 1986. "Oregon Spring" and "Santiam" parthenocarpic tomatoes. *HortScience*, 21: 1245-1247.

Bagget, J.R.; Mansour, N.S.; Kean, D. 1995. "Oregon Star" and "Oregon Pride" parthenocarpic tomatoes. *HortScience*, 30 (3): 426-444.

Bagget, J.R.; Kean, D. Mansour, N.S. 1997. "Siletz" parthenocarpic tomato. *HortScience*, 32 (7): 1299-1300.

Baldwin, E.A.; Scott, J.W.; Einstein, M.A.; Malundo, T.M.M.; Shewfelt, R.L.; Tandon, K.S. 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123 (5): 906-915.

Baldwin, E. A.; Thompson, K. 2000. Effect of sugar type and concentration on perception of tomato sweetness. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 113: 287-289.

Baldwin, E.A.; Scott, J.W.; Shewmaker, C.K.; Schuch, W. 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *Hortscience* 35:1013–1022.

Baldwin, E.A.; Goodner, K.; Plotto, A.; Pritchett, K.; Einstein, M.A. 2004. Effect of volatiles and their concentration on perception of tomato descriptors, *J. Food Sci.* 8: 310–318.

Bandurski, R.S.; Cohen, J.D.; Slovin, J.P.; Reinecke, D.M. 1995. Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies PJ editor. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 39–65.

Bangerth, F.; Sjut, V. 1978. Induced parthenocarpy - a tool for investigating hormone-regulated physiological processes in fruits. *Acta Horticulturae*, 80 :169-174.

Baxter C.J.; Carrari F.; Bauke A.; Overy S.; Hill S.A.; Quick P.W.; Fernie A.R.; Sweetlove, L.J. 2005. Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant Cell Physiol.* 46: 425-437.

Beals, T.P.; Golberg, R.B. 1997. A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. *Plant Cell.* 9: 1527-1545.

Beltrán, J.P.; Roque, E.; Medina, M.; Madueño, F.; Gómez, M.D.; Cañas, L.A. 2007. Androesterilidad inducida mediante ingeniería genética en plantas: fundamentos y aplicaciones biotecnológicas. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73 (4): 1237-1264.

- Benjamini, Y.; Hochberg, Y. 1995.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc.* 57: 289-300.
- Bennett, M. J.; Marchant, A.; Green, H. G.; May, S. T.; Ward, S. P.; Millner, P. A.; Walker, A. R.; Schulz, B.; Feldmann, K. A. 1996.** Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, 273: 948-50.
- Ben-Nissan, G.; Lee, J.Y.; Borohov, A.; Weiss, D. 2004.** GIP, a *Petunia hybrida* GA-induced cysteine-rich protein: a possible role in shoot elongation and transition to flowering. *Plant J*, 37:229-238.
- Berna, A.; Lammertyn, J.; Buysens, S.; Di Natale, C.; Nicolai, B. 2005b.** Mapping consumer liking of tomatoes with fast aroma profiling techniques. *Postharvest biology and technology*, 38 (2): 115-127.
- Bertin, N.; Gary, C. 1998.** Tomato fruit set and competition for assimilates, during the early production period. *Acta Horticulturae*, 303: 121-126.
- Beyer, E.M.; Quebedeaux, B. 1974.** Parthenocarpy in cucumber: mechanism of action of auxin transport inhibitors. *J Am Soc Hortic Sci* 99 (5):385-390.
- Bianchi, A.; Soressi, G.P. 1969.** Mutanti di pomodoro artificialmente indotti suscettibili di utilizzazione nel miglioramento genetico. *Sementi Elette XV*: 2-6.
- Bishop, C.J. 1954.** A Stamenless Male-Sterile Tomato. *American Journal of Botany* 41 (7): 540-542.
- Bishop, A.; Mähönen, A.P.; Helariutta, Y. 2006.** Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development*, 133: 1857-1869.
- Bisogni, C.A.; Armbruster, G. 1976.** Quality comparisons of room ripened and field ripened tomato fruits. *Journal of Food Science* 41: 333-337.
- Bohner, J.; Bangerth, F. 1988.** Cell number, cell size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon pimpinellifolium* differing in fruit size. *Physiol. Plant.* 72: 316-320.
- Bonnema, G.; Hontelez, J.; Verkerk, R.; Zhang, Y.Q.; van Daelen, R.; van Kammen, A.; Zabel, P. 1996.** An improved method of partially digesting plant megabase DNA suitable for YAC cloning: application to the construction of a 5.5 genome equivalent YAC library of tomato. *Plant Journal.* 9 (1): 125-133.
- Bovy, A.; Schijlen, E.; Hall, R.D. 2007.** Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics. 3: 399-412.
- Bramley, P. M. 2002.** Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany*, 53 (377): 2107-2113.
- Brauss, M.S.; Lindforth, R.S.T.; Taylor, A.J. 1998.** Effect of variety, time of eating and fruit-to-fruit variation on volatile release during eating of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*). *J. Agr. Food Chem.* 46: 2287-2292.

- Brossard, C.; Rousseau, F.; Dumont, J.P. 2007.** Perceptual interactions between characteristic notes smelled above aqueous solutions of odorant mixtures. *Chemical Senses*, 32: 319-327.
- Bruhn, C. M.; Feldmann, N.; Garlitz, C.; Harwood, J.; Ivans, E.; Marshall, M.; Riley, A.; Thurber, D. y Williamson, E. 1991.** Consumer perceptions of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *Journal of Food Quality*, 14: 187-195.
- Brukhin, V.; Hernould, M.; Gonzáles, N.; Chevalier, C.; Mouras, A. 2003.** Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Sex Plant Reprod.* 15: 311-320.
- Brummell, D.A.; Harpster, M.H. 2001.** Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47: 311-340.
- Brummell, D.A.; Howie, W.J.; Ma, C.; Dunsmuir, P. 2002.** Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin. *Postharvest Biology and Technology*, 25: 209-220.
- Bucheli, P.; Voirol, E.; Torre, R.; Lopez, J.; Rytz, A.; Tanksley, S.D.; Petiard, V. 1999.** Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *J. Agric. Food Sci.* 47: 659-664.
- Buck y Sparks, 1952.** Relation of ketchup color to tomato color as determined by the Hunter instrument. *Food Technol.* 6: 122-124.
- Budiman, M.A.; Mao, L.; Wood, T.C.; Wing, R.A. 2000.** A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Research*. 10: 129-136.
- Bünger-Kibler, S.; Bangerth, F. 1982-1983.** Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regul.* 1: 143-154.
- Burdock, G. A. 2002.** *Feranol's Handbook of Flavor Ingredients.* CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Busch, W.; Lohmann, J.U. 2007.** Profiling a plant: expression analysis in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 136-141.
- Butelli, E.; Titta, L.; Giorgio, M.; Mock, H.P.; Matros, A.; Peterek, S.; Schijlen, E.G.W.M.; Hall, R.D.; Bovy, A.G.; Luo, J.; Martin, C. 2008.** Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*, 26:1301-1308.
- Buttery, R. G. 1993.** Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits. *En Flavor Science: Sensible Principles and Techniques.* Acree, T. E. y Teranishi, R. (Eds.). Amer. Chem. Soc., Washington, D.C. 259-281.
- Buttery, R.G.; Ling, L.C. 1993.** Volatile components of tomato fruit and plants parts. Relationships and biogenesis. *Amer.Chem.Soc.* 525: 23-24.

Buttery, R.G.; Teranishi, R.; Ling, L.C. 1987. Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *J. Agric. Food Chem.*, 35: 540-544.

Buttery, R.G.; Teranishi, R.; Ling, L.C.; Turnbaugh, J.G. 1990. Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles: *J Agric Food Chem* 38: 336–340.

Cantwell, M. 1998. Optimun procedures for ripening tomatoes. In Kader, A. (Ed) *Management of fruit ripening, Postharvest Horticulture Series*. University of California, Davis, 9. Postharvest Outreach Program.

Carmi, N.; Salts, Y.; Dedicova, B.; Shabtai, S.; Barg, Rivka. 2003. Induction of parthenocarp in tomato via expression of the *rolB* gene in ovario. *Planta*. 217: 726-735.

Carrari, F.; Baxter, C.; Usadel, B.; Urbanczyk-Wochniak, E.; Zanon, M.I.; Nunes-Nesi, A.; Nikiforova, V.; Centero, D.; Ratzka, A.; Pauly, M.; Sweetlove, L.J.; Fernie, A.R. 2006. Integrated Analysis of Metabolite and Transcript levels Reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Phisiology*, 142: 1380-1396.

Casanova, A.S. 1991. El manejo del cultivo del tomate. Documento técnico informativo. En: Seminario FAO sobre producción, manejo post-cosecha, procesamiento y mercados de cultivos hortícolas selectos (ajo, cebolla y tomate). FAO, La Habana, Cuba, 19-22.

Cebolla-Cornejo, J. 2005. Recuperación de variedades tradicionales de tomate y pimiento: caracterización y mejora genética. Proquest Information and Learning, Ann Arbor.

Cebolla-Cornejo, J.; Roselló, S.; Beltran, J.; Serrano, E.; Nuez, F. 2006. Análisis de perfiles aromáticos en variedades tradicionales y comerciales de tomate. *Actas de Horticultura* 45, en prensa.

Chalukova, M.; Manuehyan, H. 1991. Breeding for carotenoid pigments in tomato. In Kallo G. (ed.), *Genetic improvement of tomato*, 179-195. Springer-Verlag, Berlin.

Chamarro, J. 1995. Anatomía y Fisiología de la Planta. En: Nuez F (ed). *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, 44-91.

Chu, M.C.; Thompson, A.E. 1972. Morphology and genetics of fleshy calyx and their relation to crack resistance in tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97(2): 197-203.

Chug-Ahuja, J.K.; Holden, J.M.; Forman, M.R.; Mangels, A.R.; Beecher, G.R.; Lanza, E. 1993. The development and application of a carotenoid database for fruits, vegetables, and selected multicomponent foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 93: 318-323.

Church, G.M.; Gilbert, W. 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1991-1995.

Clark, G.B.; Thompson, G.; Jr and Roux, S.J. 2001. Signal transduction mechanisms in plants: an overview. *Curr. Sci.* 80: 170-177.

Clifford, M.N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agr.* 79: 362-372.

Cohen, J.D.; Bandurski, R.S. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Ann Rev Plant Physiol*, 33:403–30.

Cohen, J.D.; Slovin, J.P.; Hendrickson, A. 2003. Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 8: 197-199.

Cosgrove, D. J. 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol Biochem*, 38:109-124.

Cotner, S.D.; Burns, E.E.; Leeper, P.W. 1969. Pericarp anatomy of crack-resistant and susceptible tomato fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 94 (2): 136-137.

Cramer, C.L.; Edwards, K.; Dron, M.; Liang, X.; Dildine, S.L.; Bolwell, G.P.; Dixon, R.A.; Lamb, C.J.; Schuch, W. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol. Biol.* 12, 367-383.

Czechowski, T.; Bari, R.P.; Stitt, M.; Scheible, W.R.; Udvardi, M.K. 2004. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors. Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J*, 38:366-379.
tomate. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, 44-91.

Davies, J.N; Hobson, G.E. 1981. The constituents of tomato fruit. The influence of environment, nutrition and genotype. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 205-280.

Davison, P.A. 2002. Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in arabidopsis. *Nature* 418: 203–206.

Day, C. D.; Bernard, F. C.; Irish, G.; Irish, V. 1995. Genetic ablation of petal and stamen primordial to elucidate cell interactions during floral development. *Development*. 121: 2887-2895.

Day, C. D.; Irish, V. F. 1997. Cell ablation and the analysis of plant development. *Trends Plant Sci.* 2: 106-111.

De Block, M.; Debrouwer, D., Moens, T. 1997. The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of a *barnase* gene under the control of *tapetum* specific promoters. *Theor Appl Genet.* 95, 125-131.

De Jong, M.; Wolters-Arts, M.; Feron, R.; Mariani, C.; Vrienzen, W.H. 2009. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SIARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *The Plant Journal* 57:160-170.

De la Fuente, J.I.; Amaya, I.; Castillejo, C.; Sanchez-Sevilla, J.F.; Quesada, M.A.; Botella, M.A.; Valpuesta, V. 2006. The strawberry gene FaGAST affects plant growth through inhibition of cell elongation. *J. Exp. Bot.* 57: 2401-2411.

Dharmasiri, N.; Dharmasiri, S.; Estelle, M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435:441-445.

Dixon, R.A.; Achnine, L.; Kota, P.; Liu, C.J.; Reddy, M.S.S.; Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defense genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390.

Dong, F.; Jiang, J. 1998. Non-Rabl patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells. *Chromosome Res.* 6: 551–558.

Dorais, M.; Dorsal, R.; Demers, D.A.; Micevic, D.; Turcotte, G.; Hao, X.; Papadopoulos, A.P.; Ehret, D.L.; Gosselin, A.; Hao, X.M.; Sonneveld, C.; Berhoyen, M.N.J. 2001. Improving tomato fruit quality by increasing salinity: effects on ion uptake, growth and yield. *Acta Hort.* 511: 185-195.

Dorais, M; Ehret, D.L; Papadopoulos, A.P. 2008. Tomato (*Solanum lycopersisum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem. Rev.* 7: 231-250.

Dorcey, E.; Urbez, C.; Blázquez, M.A.; Carbonell, J.; Perez-Amador, M.A. 2009. Fertilization-dependent auxina response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 58:318-332.

Elliot, K.A.C.; Hobbiger, F. 1959. Gamma aminobutyric acid: circulatory and respiratory effects in different species: re-investigation of the anti-strychnine action in mice. *J. Physiol.* 146, 70-84.

Ellul, P.; García-Sogo, B.; Pineda, B.; Ríos, G.; Roig, L.A.; Moreno, V. 2003. The ploidy level of transgenic plant in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledon (*Lycopersicon esculentum*. L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theor. Appl. Genet* 106: 231-238.

Esau, K. 1976. Anatomía Vegetal. Ediciones Omega, Barcelona.

Ewin, R.M.; Ben, Kahla, A.; Poirot, O.; Lopez, F.; Audic, S.; Claverie, J.M. 1999. Large-scale statistical analysis of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res*, 9: 950-959.

FAO. 2008. <http://faostat.fao.org/>

Farabee, M.J. 2001. Flowering Plant Reproduction: Fertilization and Fruits. The Online Biology Book. Estrella Mountain Community College, Arizona.

Faurobert, M.; Mihr, C.; Bertin, N.; Pawlowski, T.; Negroni, L.; Sommerer, N.; Causse, M. 2007. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiology*, 143: 1327-1346.

Fei, Z.J.; Tang, X.; Alba, R.M.; White, J.A.; Ronning, C.M.; Martin, G.B.; Tanksley, S.D.; Giovannoni, J.J. 2004. Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. *Plant Journal*, 40: 47-59.

Feinberg, A.; Vogelstein; B. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.

Ferrie, B. J.; Beaudoin, N.; Burkhart, W.; Bowsher, C. G.; Rothstein, S. J. 1994. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiology*, 106: 109-118.

- Ficcadenti, N.; Sestili, S.; Pandolfini, T.; Cirillo, Ch.; Rotino, G. L.; Spena, A. 1999.** Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Mol. Breeding*. 5: 463-470.
- Fillatti, J.J.; Kiser J.; Rose, R.; Luca, C. 1987.** Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Biotechnology* 5:726-730.
- Fisher, C.; Scott, T. R. 2000.** Flavores de los alimentos. Biología y química. ACRIBIA, Zaragoza.
- Fleet, C.M.; Sun, T-p. 2005.** A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Op Plant Biol* 8:77-85.
- Foolad, M.R. 2007.** Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 1-52.
- Fos, M.; Nuez, F.; García-Martínez, J. L. 2000.** The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol*. 122: 471-479.
- Fos, M.; Proaño, K.; Nuez, F.; García-Martínez, J.L. 2001.** Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiol. Plant*. 111: 545-550.
- Frary, A.; Fulton, T.M.; Zamir, D.; Tanksley, S.D. 2004.** Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* X *L. penelli* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae. *Theor. Appl. Genet*. 108: 485-496.
- Frigerio, M.; Alabadí, D.; Pérez-Gómez, J.; García-Cárcel, L.; Phillips, A.L.; Hedden, P.; Blázquez, M.A. 2006.** Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 142:553-563.
- Fuke, S.; Shimizu, T. 1993.** Sensory and preference aspects of umami. *Trends in food science*, 4 (8): 246-251.
- Gälweiler, L.; Guan, C.; Müller, A.; Wisman, E.; Mendgen, K.; Yephremov, A.; Palme, K. 1998.** Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in Arabidopsis Vascular Tissue. *Science* 282: 2226-2230.
- García, E.; Barrett, D.M. 2006.** Peelability and Yield of processing tomatoes by stem or lye. *Journal of Food Processing and Preservation* 30: 3–14.
- García-Martínez, J.L.; Hedden, P. 1997.** Gibberellins and fruit development. In: *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Tomás-Barberán FA and Robins RJ, eds. Clarendon Press: Oxford, 263–286.
- García-Martínez, J.L.; Santes, C.M.; Croker, S.; Hedden, P. 1991.** Identification, quantitation and distribution of gibberellins in fruit of *Pisum sativum* cv. Alaska during pod development. *Planta*, 184: 53-60.

García-Sogo, B.; Pineda, B.; Castelblanque, L.; Antón, T.; Medina, M.; Roque, E.; Torresi, C.; Beltrán, J.P.; Moreno, V.; Cañas, L.A. 2010. Efficient transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* and production of male-sterile plants by engineered anther ablation. *Plant Cell Rep*, 29: 61-67.

Genovés, S.; Gil, J. V.; Manzanares, P.; Alexandre, J. L. y Vallés, S. 2003. *Candida molischiana* β -glucosidase production by *Saccharomyces cerevisiae* and its application in winemaking. *Journal of Food Microbiology and Safety*, 68 (6): 2096-2100.

George, W. L.; Scott, J. W.; Splittstoesser, W. E. 1984. Parthenocarpy in tomato. *Hort. Rev.* 6: 65-84.

Georgiev, K.H.; Mikhailov. 1986. New cases of recombination involving the genes *c*, *sp* and *B* in tomato. *Plant Breeding Abstr.* 56 (9): 888.

Gil, J. V.; Manzanares, P.; Genovés, S.; Vallés, S. y González-Candelas, L. 2005. Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *International Journal of Food Microbiology*, 103: 57-68.

Gillaspy, G; Ben-David, H; Gruissem, W. 1993. Fruits: a developmental perspective.
Giovannoni, J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16 Suppl: 170-180.

Goetz, M.; Godt, D. E.; Guivarc, H.; Kahmann, U.; Chriqui, D.; Roitsch, T. 2001. Induction of male sterility in plants by engineering of carbohydrate supply. *PNAS.* 22: 6522-6527.

Goetz, M.; Hooper, L.C.; Johson, S.D.; Rodrigues, J.C.M.; Vivian-Smith, A.; Koltunow, A.M. 2007. Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiology*, 145 (2): 351-366.

Goetz, M.; Vivian-Smith, A.; Johnson, S.D.; Koltunow, A.M. 2006. *AUXIN RESPONSE FACTOR8* is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 1873-1886.
Plant Cell 5: 1439-1451.

Goff, S.A.; Klee, H.J. 2006. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value?. *Science*, 311.

Goff, S.A.; Ricke, D. Lan, T.H.; Presting, G.; Wang, R.; Dunn, M.; Glazebrook, J.; Sessions, A.; Oeller, P.; Varma, H. 2002. A draft sequence of the genome rice (*Oryza sativa*, L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.

Gómez, M. D. 2000. *END1*, un gen de expresión específica en anteras de *Pisum sativum*. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.

Gómez, M. D.; Cañas, L. A.; Beltrán, J. P. 2004. The pea *END1* promoter drives anther-specific gene expression in different plant species. *Planta.* 219: 967-981.

Gómez, P.; Jamilena, M.; Capel, J.; Zurita, S.; Angosto, T.; Lozano, R. 1999. *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petal and stamens. *Planta*, 209: 172-179.

- Goodenough, P.W.; Tucker, G.A.; Grierson, D.; Thomas, T. 1982.** Changes in color, polygalacturonase monosaccharides and organic acids during storage of tomatoes. *Phytochemistry* 21:281-284.
- Gorguet, B.; van Heusden, A.W.; Lindhout, P. 2005.** Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biology*, 7: 131-139.
- Gorman, S.W; McCormick, S. 1997.** Male sterility in tomato. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 16 1: 31–53.
- Grasselly, D.; Navez, B.; Letard, M. 2000.** *Tomate: Pour un produit de qualité.* Paris, France: Centre Technique Interprofessionnel des fruits et Légumes. 222.
- Groot, S.P.C.; Bruinsma, J.; Karssen, C.M. 1987.** The role of the endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: Studies with a gibberellin-deficient mutant. *Physiol Plantarum*, 71: 184-190.
- Gross, J. 1991.** *Pigments in vegetables: Chlorophylls & Carotenoids.* Chapman and Hall, NY.
- Gustafson, F.G. 1936.** Inducement of fruit development by growth-promoting chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 22: 628-636.
- Gustafson, F.G. 1939.** Auxin distribution in fruits and its significance in fruit development. *Am. J. Bot.* 26: 189–194.
- Hafen, L.; Stevenson, E.C. 1958.** Preliminary studies of five *stamenless* mutants. *Tomato Genet Coop Rep.* 8: 17-18.
- Hahlbrock, K.; Scheel, D. 1989.** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology of Plant Molecular Biology* 40:347.
- Hamilton, A.J.; Baulcombe, D.C. 1999.** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 286 (5441): 950-952.
- Hanson, M. R., Conde, M. F. 1985.** Functioning and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic-nuclear interactions affecting male fertility in plants. *Inter. Rev. Cytol.* 94: 213-267.
- Hardie, D.G. 1999.** Plant protein serine/threonine kinases: Classification and Functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50: 97-131.
- Hartley, R. W.; Smeaton, J. R. 1973.** On the reaction between the extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (*Barnase*) and its intracellular inhibitor (*Barstar*). *Journal of Biol Chem.* 248: 5624-5626.
- Hedden, P.; Kamiya, Y. 1997.** Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 431-460.
- Hedden, P.; Phillips A. 2000a.** Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* 5: 523-530.
- Heilderberg, C.P.S. Americas. 1999.** Color manager manual. Disponível em: http://www.heidelbergcps.com/color/colorman/sp_ciela_1.htm.

- Hensel, L. L.; Nelson, M. A.; Richmond, T. A.; Bleecker, A. B. 1994.** The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 106, 863-876.
- Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. 1992.** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agr. Food Chem.* 40: 2379-2383.
- Ho, L; Hewitt J. 1986.** Fruit development. In: *The Tomato Crop*. Atherton JG and Rudish J (eds). New York: Chapman and Hall. 201-239.
- Hobson G.E. 1965.** Firmness of tomato fruit in relation to polygalacturonase activity. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 40 (1): 66-72.
- Hobson, G; Davies, J. 1970.** The tomato. In: *The Biochemistry of Fruits and Their Products*. Vol. II. Hulme AC (ed). London, Academic Press. 437-482.
- Hoekema, A.; Hirsch, P. R.; Hooykaas, P. J .J.; Schilperoort, R. A. 1983.** A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* tiplasmid. *Nature*. 303: 179-180.
- Huttly, A.K.; Phillips, A.L. 1995.** Gibberellin-regulated plant genes. *Physiol. Plant.* 95: 310-317.
- Imanishi, S.; Nagata, M. 2004.** The effect of methyl jasmonate on the expression of ripening related genes in tomato fruits. 45th Annual Meeting of the Japanese-Society-for-Plant-Physiologists, 45. Hachioji, JAPAN, 78.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005.** The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436: 793-800.
- Jacobsen, S.E.; Olszewski, N.E. 1993.** Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell*, 5: 887-896.
- Jaillon, O.; Aury, J.M.; Noel, B.; Policriti, A.; Clepet, C.; Casagrande, A.; Choisne, N.; Aubourg, S.; Vitulo, N.; Jubin, C. 2007.** The grapevine genome sequence suggest ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-467.
- Johnson, S.P.; Hall, W.C. 1954.** Parthenocarpy in the tomato. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 63: 329-332.
- Jones, C.M.; Mes, P.; Myers. 2003.** Characterization and inheritance of the *Anthocyanin fruit (Atf)* Tomato. *Journal of Heredity*, 94 (6): 449-456.
- Jones, R.A.; Scott, S.J. 1984.** Genetic potential to improve tomato flavor in commercial F₁ hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109: 318-321.
- Kader, A. A.; Stevens, M. A.; Albright-Holton, M.; Morris, L. L. y Algazi, M. 1977.** Effect of fruit ripeness when picked on flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102 (6): 724-731.

- Kalamaki, M.S.; Harpster, M.H.; Palys, J.M.; Labavitch, J.M.; Reid, D.S.; Kalamaki, M.S.; Powell, L.T.; Strujis, K.; Labavitch, J.M.; Reid, D.S.; Bennett, A.B. 2003.** Transgenic overexpression of expansin influences particle size distribution and improves viscosity of tomato juice and paste. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 7465-7471.
- Kang, H.G.; Jeong, J.S.; Lee, S.; An, G. 1998.** Identification of class B and class C floral organ identity genes from rice. *Plant Mol. Biol.* 38: 1021-1029.
- Kataoka, K.; Uemachi, A.; Yazawa, S. 2003.** Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellins, in *pat-2* and auxininduced parthenocarpic tomato fruits. *Scientia Hort.* 98: 9-16.
- Kawamura, K.; Kare, M. 1987.** Umami: A basic Taste. Marcel Dekker Publ. New York, NY, USA.
- Kazan, K.; Manners, J.M. 2009.** Linking development to defense: auxina in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 14(7): 373-382.
- Kean, D.; Baggett, J.R. 1986.** The inheritance of parthenocarpy in Oregon T5-4 tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111: 596-599.
- Kepinsky, S.; Leyser, O. 2005.** The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435: 446-451.
- Kimble, J. 1981.** Alterations in cell lineage following laser ablation of cells in the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 87: 286-300.
- Kisaka, H.; Kida, T. 2003.** Transgenic tomato plant carrying a gene for NADP-dependent glutamate dehydrogenase (gdhA) from *Aspergillus nidulans*. *Plant Sci*, 164: 35-42.
- Knudsen, J.T.; Tollsten, L.; Bergstrom, G. 1993.** Floral scents: a check list of volatile compounds isolated by headspace techniques. *Phytochemistry* 33: 253-280.
- Koch, J. L.; Nevins, D. J. 1989.** Tomato Fruit Cell Wall: I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. *Plant Physiol*, 91: 816-822.
- Koshioka, M.; Nishijima, T.; Yamazaki, H.; Liu, Y.; Nonaka, M.; Mander, L.N. 1994.** Analysis of gibberellins in growing fruits of *Lycopersicon esculentum* after pollination or treatment with 4-chlorophenoxyacetic acid. *J. Hort. Sci.* 69: 171-179.
- Krumbein, A.; Auerswald, H. 1998.** Characterization of aroma volatiles in tomatoes by sensory analyses. *Nahrung* 42: 395-399.
- Laing, D.G, Links A. 1996.** Flavour perception mechanisms. *Trends Food Sci Technol* 7:387-9.
- Langlois, D.; Etievant, P.X.; Pierron, P.; Jorrot, A. 1996.** Sensory and instrumental characterisation of commercial tomato varieties. *Z Lebensm Unters Forsch* 203: 534-540.

Laporte, M.M.; Galagan, J.A.; Prash, A.L.; Vanderveer, P.J.; Hanson, D.T.; Shewmaker, C.K.; Sharkey, T.D. 2001. Promoter strength and tissue specificity effects on growth to tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta*, 212: 817-822.

Laporte, M.M.; Galagan, J.A.; Shapiro, J.A.; Boersig, M.R.; Shewmaker, C.K.; Sharkey, T.D. 1997. Sucrose phosphate synthase activity and yield analysis of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta* 203: 253-259.

Larson, R.E.; Paur, S. 1948. The description and inheritance of a functionally sterile flower mutant in tomato and its probable value in hybrid tomato seed production. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 52: 355-364.

LeClere, S.; Tellez, R.; Rampey, R.A.; Matsuda, S.P.T.; Bartel, B. 2002. Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 277: 20446-20452.

Lee, L.; Kang, S.A.; Lee, H.O.; Lee, B.H.; Jung, I.K.; Lee, J.E.; Heo, Y.S. 2001. Effect of supplementation of vitamin E and vitamin C on brain acetylcholinesterase activity and neurotransmitter levels in rats treated with scopolamine, an inducer of dementia. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 47: 323-328.

Lee, Y-H.; Chung, K-H.; Kim, H-U.; Jin, Y-M. 2003. Induction of male sterile cabbage using a *tapetum*-specific promoter from *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*. *Plant Cell Rep.* 22, 268-273.

Lemaire-Chamley, M.; Petit, J.; García, V.; Just, D.; Baldet, P.; Germain, V.; Fagard, M.; Mouassite, M.; Cheniclet, C.; Rothan, C. 2005. Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiol.* 139: 750-769.

Levy, A.; Rabinowitch, H.D.; Kedar, N. 1978. Morphological and physiological characters affecting flower drop and fruit set of tomatoes at high temperatures. *Euphytica*, 27:211-218.

Lewinsohn, E.; Sitrit, Y.; Bar, E.; Azulay, Y.; Meir, A.; Zamir, D.; Tadmor, Y. 2005b. Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *J. Agric. Food Chem.* 53 (8): 3142–3148.

Libby, P.; Aikawa, M. 2002. Vitamin C, collagen, and cracks in the plaque. *Circulation* 105: 1396-1398.

Lichtenthaler, H.; Rohmer, M.; Schwender, J. 1997. Two independent biochemical pathways for isopentyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 101:643-652.

Lifschitz, E.; Brodai, L.; Hareven, D.; Hurwitz, C.; Prihadash, A.; Pnueli, L.; Samach, A.; Zamir, D. 1993. Molecular mapping of flower development in tomato. En: *Molecular Biology of tomato*. Ed. Yoder, J. Technomic. Lancaster PA, USA, 175-184.

Lin, S.; George, W. L.; Splittstoesser, W. E. 1984. Expression and inheritance of parthenocarpy in "Severianin" tomato. *J. Hered.* 75: 62-66.

- Linnaeus, C. 1753.** *Species Plantarum*. Holmiae. Stockholm, Sweeden, 1st edition.
- Lippman, Z.; Tanksley, S.D. 2001.** Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small fruited species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics*, 158: 413-422.
- López Camelo, A.; Gómez, P. 2004.** Comparison of color index for tomato ripening. *Horticultura Brasileira* 22 (3): 534-537.
- Lozano, R.; Angosto, T.; Gómez, P.; Payan, C.; Capel, J.; Huijser, P.; Salinas, J.; Martínez-Zapater, J.M. 1998.** Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expresión of MADs-box genes. *Plant Phisiology*. 117: 91-100.
- Luan, S. 2003.** Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 54: 63-92.
- Lücker, J.; Bouwmeester, H.J.; Aharoni, A. 2007.** Metabolic Engineering of Terpenoid Biosynthesis in plants. In Verpoorte, R; Alfermann, A.W; Johnson, T.S. (ed). *Applications of Plant Metabolic Engineering*. Springer Pub, The Netherlands, 219-236.
- Lukyanenko, A. N. 1991.** Parthenocarpy in tomato. En: *Genetic improvement of tomato*; Monogrhas on Theoretical and Applied Genetics, 14. Eds. Springer-Verlag, Alemania, 167-178.
- Lunn, J.E.; Gillespie, V.J.; Furbank, R.T. 2003.** Expression of a cyanobacterial sucrose phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *J. Exp. Bot.* 54: 223-237.
- Luschig, C.; Gaxiola, R. A.; Grisafi, P.; Fink, G. R. 1998.** EIR1, a rootspecific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 12: 2175-87.
- Mahakun, N; Leeper, P.W; Burns, E.E. 1979.** Acidic constituents of various tomato fruits types. *J. Food Sci.* 44:1241-1244.
- Maisonneuve, B, 1978.** Pollination of the tomato at low temperatures. Ph.D. Diss. Academie de Montpellier, France.
- Malundo, T.M.; Shewfelt, R.L.; Scott, J.W. 1995.** Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, 6: 103-110.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. 1982.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Manset, J.D. 1998.** *Botany: An introduction to plant Biology*. 2nd edition. Jones & Bartell Eds. Boston. USA.
- MAPA, 1993.** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. "Métodos Oficiales de Análisis. Tomo II, Madrid.
- Mapelli, S.; Lombardi, L.; Bertani, A. 1993.** The effect of growth substances on rice germination and growth under anoxia. *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)* 12: 9-15.

- Mapelli, S.; Torti, G.; Badino, M.; Soressi, G. P. 1979.** Effects of GA₃ on flowering and fruit-set in a mutant of tomato. Hort. Sci. 14: 736-737.
- Mapelli, S.C.; Frova, C.; Torti, G.; Soressi, G. 1978.** Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. Plant Cell Physiol. 19:1281-1288.
- Mapelli, S.C.; Lombardi, L. 1982.** A comparative auxin and cytokinin study in normal and *to-2* mutant tomato plants. Plant Cell Physiol 23:751-757.
- Marais, J. 1983.** Principaux monotérpenols odorants du cépage Muscatés. South Africa Journal of Enology and Viticulture 4: 49-58.
- Mariani, C.; Beuckeleer, M. D.; Truettner, J.; Leeman, J.; Goldberg, R. B. 1990.** Induction of male sterile in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature. 347 : 737-741.
- Marlatt, C.; Ho, C.T.; Chien, M. 1992.** Studies of aroma constituents bound as glycosides in tomato. J. Agric. Food Chem. 40, 249-252.
- Martí, C.; Orzáez, D.; Ellul, P.; Moreno, V.; Carbonell, J.; Granell, A. 2007.** Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. Plant J. 52(5): 865-876.
- Martinelli, F.; Uratsu, S.L.; Reagan, R.L.; Chen, Y.; Tricoli, D.; Fiehn, O.; Rocke, D.M.; Gasser, C.S.; Dandekar, A.M. 2009.** Gene regulation in parthenocarpic tomato fruit. Journal of Experimental Botany, 60: 3873-3890.
- Mayne, S.T. 1996.** Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. FASEB J. 10: 690-701.
- Mazzucato, A.; Taddei, A. R.; Soressi, G. P. 1998.** The *parthenocarpic fruit (pat)* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. Development. 125: 107-114.
- Mazzucato, A.; Testa, G.; Biancari, T.; Soressi, G. 1999.** Effect of acid treatments, environmental conditions and genetic background on the expression of the *parthenocarpic fruit* mutation in tomato. Protoplasma. 208: 18-25.
- MacArthur, J.W.; Butler, L. 1938.** Size inheritance and geometric growth processes in the tomato fruit. Genetics, 23: 253.
- McCormick, S.; Niedermeyer, J.; Fry, J.; Barnason, A.; Horsch, R.; Fraley, R. 1986.** Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 5: 81-84.
- McDonald, R.E.; McCollum, T.G.; Baldwin, E.A. 1999.** Temperatura of water heat treatments influences tomato fruit quality following low-temperature storage. Postharvest Biology and Technology 16:147-155.
- McGinnis, K.M.; Thomas, S.G.; Soule, J.D.; Strader, L.C.; Zale, J.M.; Sun, T.P.; Steber, C.M. 2003.** The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. Plant Cell 15: 1120-1130.

McGlasson, W.B.; Last, J.H.; Shaw, K.J.; Meldrum, S.K. 1987. Influence of the non-ripening mutants *rin* and *nor* on the aroma of tomato fruit. *HortScience* 22: 632-634.

Mencarelli, F.; Saltveit, J.R.; M.E. 1988. Ripening of mature-green tomato fruit slices. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 113 (5): 745.

Meyers, B.C.; Galbraith, D.W.; Nelson, T.; Agrawal, V. 2004. Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate. *Plant Physiol*, 135: 637-652.

Mezzetti B.; Landi, L.; Pandolfini, T.; Spena, A. 2004. The *DefH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnology*, 4:4.

Mikami K.; Murata, N. 2003. Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. *Prog. Lipid Res.* 42: 527–543.

Miller, P. 1754. *The Gardeners Dictionary*. John and Francis Rivington. London, UK, 4th edition.

Mohamed, F. 1998. Characteristics and inheritance of natural facultative-parthenocarpic fruit-set in “Nadja” tomato under low temperatures conditions. *Euphytica*, 103: 211-217.

Moon, J.; Parry, G.; Estelle, M. 2004. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *The Plant Cell*, 16: 3181-3195.

Mueller, L.A.; Solow, T.H.; Taylor, N.; Skwarecki, B.; Buels, R.; Binns, J.; Lin, Ch.; Wright, M.; Ahrens, R.; Wang, Y.; Herbst, E.V.; Keyder, E.; Menda, N.; Zamir, D.; Tanksley, S.D. 2005. The SOL genomics network, a comparative resource for solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology*. 138: 1310-1317.

Mueller, L.A.; Lankhorst, R.K; Tanksley, S.D.; Giovannoni, J.J.; White, R.; Vrebalov, J.; Fei, Z.; van Eck, J.; Buels, R.; Mills, A.A.; Menda, N.; Tecle, I.Y.; Bombarely, A.; Stack, S.; Royer, S.M.; Chang, S.B.; Shearer, L.A.; Kim, B.D.; Jo, S.H.; Hur, C.G.; Choi, D.; Li, C.B.; Zhao, J.; Jiang, H.; Geng, Y.; Dai, Y.; Fan, H.; Chen, J.; Lu, F.; Shi, J.; Sun, S.; Chen, J.; Yang, X.; Lu, C.; Chen, M.; Cheng, Z.; Li, C.; Ling, H.; Xue, Y.; Wang, Y.; Seymour, G.B.; Bishop, G.J.; Bryan, G.; Rogers, J.; Sims, S.; Butcher, S.; Buchan, D.; Abbott, J.; Beasley, H.; Nicholson, C.; Riddle, C.; Humphray, S.; McLaren, K.; Mathur, S.; Vyas, S.; Solanke, A.U.; Kumar, R.; Gupta, V.; Sharma, A.K.; Khurana, P.; Khurana, J.P.; Tyagi, A.; Chowdhury, P.; Shridhar, S.; Chattopadhyay, D.; Pandit, A.; Singh, P.; Kumar, A.; Dixit, R.; Singh, A.; Praveen, S.; Dalal, V.; Yadav, M.; Ghazi, I.A.; Gaikwad, K.; Raj, T.; Mohapatra, T.; Singh, N.K.; Szinay, D.; de Jong, H.; Peters, S.; van Staveren, M.; Datema, E.; Fiers, M.W.E.J.; van Ham, R.C.H.J.; Lindhout, P.; Philippot, M.; Frasse, P.; Regad, F.; Zouine, M.; Bouzayen, M.; Asamizu, E.; Sato, S.; Fukuoka, H.; Tabata, S.; Shibata, D.; Botella, M.A.; Perez-Alonso, M.; Fernandez-Pedrosa, V.; Osorio, S.; Mico, A.; Granell, A.; Zhang, Z.; He, J.; Huang, S.; Du, Y.; Qu, D.; Liu, L.; Liu, D.; Wang, J.; Ye, Z.; Yang, W.; Wang, G.; Vezzi, A.; Todesco, S.; Valle, G.; Falcone, G.; Pietrella, M.; Giuliano, G.; Grandillo, S.; Traini, A.; D’Agostino, N.; Chiusano, M.L.; Ercolano, M.; Barone, A.; Frusciante, L.; Schoof, H.; Jöcker, A.; Bruggmann, R.; Spannagl, M.; Mayer, K.X.F.; Camara, F.; Rombauts, S.; Fawcett, J.A.; Van de Peer, Y.; Knapp, S.; Zamir, D.; Stiekema, W. 2009. A Snapshot of the Emerging Tomato Genome Sequence. *The Plant Genome*, 2: 78-92.

- Murashige, T.; Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–479.
- Navez, B.; Letard, M.; Graselly, D.; Jost, M. 1999.** Les critères de qualité de la tomate, *Infos-Ctifl* 155: 41–47.
- Nguyen, M.L.; Schwartz, S.J. 1999.** Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technol.* 53: 38-45.
- Nikkilä, J.; Törönen, P.; Kaski, S.; Venna, J.; Castrén, E.; Wong, G. 2002.** Analysis and visualization of gene expression data using self-organizing maps. *Neural Networks* 15: 953-966.
- Nilsson, O.; Wu, E; Wolfe, D.S; Weigel, D. 1998.** Genetic ablation of flowers in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* 15: 799-804.
- Nitsch, J.P. 1950.** Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *Am J Bot.* 87: 211-215.
- Nitsch, J.P. 1970.** Hormonal factors in growth and development. In: *The biochemistry of fruits and their products.* Hulme A (ed). Academic Press, London. 1: 427-472.
- Normanly, J.; Slovin, J.P.; Cohen, J.D. 2004.** Auxin biosynthesis and metabolism. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action* Davies J (ed). Kluwer Acad. Pub. Dordrecht, The Netherlands. 36-62.
- Nuez, F. 1995.** Desarrollo de nuevos cultivares. In F. Nuez (ed.). *El cultivo del tomate.* Mundiprensa, Madrid, 625-670.
- Nuez, F.; Costa, J.; Cuartero, J. 1986.** Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties "Sub-Artic Plenty", "75/79" and "Severianin". *Z Planzenzüchtg.* 96: 200-206.
- Nuez, F.; Cuartero, J.; Ferrando, C.; Catalá, M.S.; Costa, J. 1987.** Inheritance of parthenocarpy for the tomato strain 75/59. Abstracts of the XIV International Botanical Congress (berlin, 24, July to 1 August): 190.
- Nuez, F.; Cuartero, J.; Ferrando, C.; Catalá, M.S.; Costa, J. 1988.** Genetic model for inheritance for the parthenocarpy in the tomato line "75/59". *An. Aula Dei,* 19 (1-2): 7-11.
- Nuez, F.; Cuartero, J.; Palomares, G.; Costa, J. 1984.** Collections of *Lycopersicon esculentum* and *L. esculentum* var. *cerasiforme* carried out in Mexico. T.G.C. Report, 34: 39-42.
- Nuez, F.; Diez, M. J.; Pico, B. y Fernández de Córdoba, P. 1996.** Catálogo de semillas de tomate. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid.
- Ogihara, Y.; Mochida, K.; Nemoto, Y.; Murai, K.; Yamazaki, Y.; Shin, I.T.; Kohara, Y. 2003.** Correlated clustering and virtual display of gene expression patterns in the wheat life cycle by large scale statistical analyses of expressed sequence tags. *Planta J.* 33: 1001-1011.

- Olimpieri, I.; Siligato, F.; Caccia, R.; Soressi, G.P.; Mazzucato, A.; Mariotti, L.; Ceccarelli, N. 2007.** Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*, 226: 877-888.
- Olszewski, N.; Sun, T.P.; Gubler, F. 2002.** Gibberellin signalling, biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 14: 61-80.
- Oruna-Concha, M.J.; Methven, L.; Blumenthal, H.; Young, C.; Mottram, D.S. 2007.** Differences in glutamic acid and 5'-ribonucleotide contents between flesh and pulp of tomatoes and the relationship with umami taste. *J Agric Food Chem* 55: 5776-5780.
- Ozga, J.A.; Yu, J.; Reinecke, D.M. 2003.** Pollination-, development-, and auxin-specific regulation of gibberellin 3 β -hydroxylase gene expression in pea fruit and seeds. *Plant Physiol* 131:1137-1146.
- Paddon, C. W.; Hartley, R.W. 1985.** Cloning, sequencing and transcription of an inactivated copy of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular ribonuclease (*barnase*) Gene. 10: 231-239.
- Paddon, C.; Hartley, R. W. 1987.** Expression of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular ribonuclease (*barnase*) in *Escherichia coli* following an inactivating mutation. *Gene*. 53: 11-19.
- Palomares, G. 1999.** Mejora Genética Vegetal. Servicio de publicaciones, UPV, Valencia, 237-265.
- Pandolfini, T.; Molesini, B.; Spena, A. 2007.** Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends in Plant Science*, 12 (8): 327-329.
- Pandolfini, T.; Rotino, G.; Camerini, S.; Defez, R.; Spena, A. 2002.** Optimization of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC. Biotechnology*. 2, 1-18.
- Pascual, L.; Blanca, J.M.; Cañizares, J.; Nuez, F. 2007.** Analysis of gene expresión Turing the fruit set of tomato: A comparative approach. *Plant Science*, 173: 609-620.
- Pascual, L.; Blanca, J.M.; Cañizares, J.; Nuez, F. 2009.** Transcriptomic análisis of tomato carpel development reveals alterations in ethylene and gibberellin síntesis during pat3/pat4 parthenocarpic fruti set. *BMC Plant Biology*, 9.
- Pecaut, P.; Philouze, J. 1978.** A *sha-pat* line obtained by natural mutation. *TGC Reports*. 28: 12.
- Pelaz, S.; Ditta, G. S.; Baumann, E.; Wisman, E.; Yanofsky, M. F. 2000.** B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*. 405: 200-203.
- Peralta, I.E.; Spooner, D.M. 2007.** History, origin and early cultivation of tomato (solanaceae). En *Genetic improvement of Solanaceous Crops*, 2: Tomato. Razdan, M.K; Mattoo, A.K. (eds), Science Publishers, Enfield, EE.UU.

Pharis, R.P.; King, R.W. 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 517-568.

Philouze, J. 1983. Parthenocarpie naturelle chez la tomate. I. *Revue bibliographique. Agronomie.* 3 : 311-320.

Philouze, J. ; Milesi, M. 1989. Parthénocarpie naturelle chez la tomate. IV. Etude de la parthénocarpie à déterminisme polygénique de la lignée '75/59'. *Agronomie*, 9 : 63-75.

Philouze, J.; Maisonneuve, B. 1978. Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety Severianin. *Tomato Genet Coop Rep* 28: 12-13.

Picken, A.J.F. 1984. A review of pollination and fruit set in the tomato. *J. Hort. Sci.* 59 (1): 1-13.

Pnueli, L.; Abu-Abeid, M.; Zamir, D.; Nacken, W.; Schwarz-Sommer, Z.; Lifschitz, E. 1991. The MADS-box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant J.* 1: 255-266.

Pnueli, L.; Hareven, D.; Rounsley, D.; Yanofsky, M. F. 1994. Isolation of the tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell.* 6: 163-173.

Poysa, V. 1993. Use of *Lycopersicon cheesmanii* and *L. chmielewskii* to increase dry matter content of tomato fruit. *Can. J. Plant Sci.* 73, 273–279.

Preil, W.; Reimann-Philipp, R.; 1969. Untersuchungen über die Einflüsse verschiedener Umweltfaktoren auf die Funktionsfähigkeit der Pollen von Tomaten. *Angew. Bot.*, 43: 175-193

Pretel, M.T.; Serrano, M.; Riquelme, F.; Romojaro, F. 1993. La calidad de la producción hortícola. 353-358. In M.A. Albi, F. Gutiérrez y M. Roca (eds.). *La calidad en frutas y hortalizas. Maduración y post-recolección-93.* Sevilla.

Pysh, L.D.; Wysocka-Diller, J.W.; Camilleri, C.; Bouchez, D.; Benfey, P.N. 1999. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J*, 18 :111-119.

Ravestjin, W. van. 1970. Setting of fruit in tomatoes, Peppers and strawberries. *Ann. Rep. Glasshouse Crops Res. Exp. Stat. Naaldwijk*, 57-62.

Rebers, M.; Kaneta, T.; Kawaide, H.; Yamaguchi, S.; Yang, Y.Y.; Imai, R; Sekimoto, H.; Kamiya, Y. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *Plant J.* 17: 241-250.

Reinders, G.; Thier, H.P. 1999. Non-starch polysaccharides of tomatoes I. Characterizing pectins and hemicelluloses. *European Food Research and Technology* 209: 43-46.

Reynaerts, A.; Van de Wiele, H.; De Sutter, G.; Janssens, J. 1993. Engineered genes for fertility control and their application in hybrid seed production. *Scientia Horticulturae.* 55: 125-139.

- Rick, C.M. 1948.** Genetics and development of nine male-sterile tomato mutants. *Hilgardia*, 18: 599-633.
- Rick, C.M.; Robinson, J. 1951.** Inherited defects of floral structure affecting fruitfulness in *Lycopersicon esculentum*. *Am. J. Bot.* 38: 639-652.
- Robinson, R.W.; Cantliffe, D.J.; Shannon, S. 1971.** Morphactin-induced parthenocarpy in the cucumber. *Science*, 171:1251-1252.
- Rodrigo, M.J.; García-Martínez, J.L.; Santes, C.M.; Gaskin, P.; Hedden, P. 1997.** The role of gibberellins A1 and A3 in fruit growth of *Pisum sativum* L. and the identification of gibberellins A4 and A7 in young seeds. *Planta*, 201: 446-455.
- Rodríguez-Concepción, M.; Boronat, A. 2002.** Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*, 130: 1079-1089.
- Roessner, U.; Wagner, C.; Kopka, J.; Trethewey, R.N.; Willmitzer, L. 2000.** Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography: mass spectrometry. *Plant J.* 23: 131-142.
- Rogers, S. O.; Bendich, A. J. 1984.** Extaction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Rolland, F.; Gonzalez, E.B.; Sheen, J. 2006.** Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Ann Rev Plant Biol* 57: 676-709.
- Ronning, C.M.; Stegalkina, S.S.; Ascenzi, R.A.; Bougri, O.; Hart, A.L.; Utterbach, T.R.; Vanaken, S.E.; Riedmuller, S.B.; White, J.A.; Cho, J. 2003.** Comparative análisis of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiol.* 131: 419-429.
- Roque, E.; Gómez, M.D.; Ellull, P.; Wallbraun, M.; Madueño, F.; Beltrán, J.P.; Cañas, L.A. 2007.** The *PsEND1* promoter: a novel tool to produce genetically engineered male-sterile plants by early anther ablation. *Plant. Cell Rep.* 26: 313-325.
- Roselló, S.; Galiana-Balaguer, L.; Herrero-Martínez, J.M.; Maquieira, A.; Nuez, F. 2002.** Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis. *J. Sci. Food Agr.* 82: 1101-1106.
- Roselló, S.; Nuez, F. 2006.** Mejora de la calidad del tomate para fresco. Mejora genética de la calidad en plantas, 333-360.
- Ross, J.J.; Reid, J.B.; Swain, S.M.; Hasan, O.; Poole, A.T.; Hedden, P.; Willis, C. 1995.** Genetic regulation of gibberellin deactivation in *Pisum*. *Plant J.* 7(3): 513-523.
- Rotino, G. L.; Perri, E.; Zottini, M.; Sommer, H.; Spena, A. 1997.** Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnol.* 15: 1398-1401.
- Roxrud, I.; Lid, S.E.; Fletcher, J.C.; Schmidt, E.D.; Opsahl-Sorteberg, H.G. 2007.** GASA4, one of the 14-member Arabidopsis GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant Cell Physiol* 48: 471-483.

- Ruiz J.J.; Alonso, A.; García-Martínez, S.; Valero, M.; Blasco, P.; Ruiz-Bevia, F. 2005.** Quantitative analysis of flavour volatiles detects differences among closely related traditional cultivars of tomato. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85 (1): 54-60.
- Ryder, T.B.; Cramer, C.L.; Bell, J.N.; Robbins, M.P.; Dixon R.A.; Lamb, C.J. 1984.** Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(18):5724–5728.
- Ryder, T.B.; Hedrick, S.A.; Bell, J.N.; Liang, X.W.; Clouse, S.D.; Lamb, C.J. 1987.** Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Gen Genet*, 210(2):219–233.
- Saliba Colombani, V.; Causse, M.; Langlois, D.; Philouze, J.; Buret, M. 2001.** Genetic análisis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theor Appl Genet* 102: 259–272.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989.** *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanz, M.L.; del Castillo, M.D.; Corzo, N.; Olano, A. 2000.** Presence of 2-Furoylmethyl Derivates in Hydrolysates of processed tomato products. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 468-471.
- Sawhney, V.K.; Greyson, R.I. 1973.** Morphogenesis of the stamenless-2 mutant in tomato. II. Modilieation of sex organs in the mutant and normal flowers by plant hormones, *Canadian Journal of Botany* 51: 2473-2479.
- Scott, J.W.; George, W.L. 1984.** Influence of pollination treatments on fruit set and development in parthenocarpic tomato. *HortScience*, 19: 874-876.
- Scott, J.W.; Harbough, B. 1989.** *Micro-Tom. A miniature dwarf tomato.* Florida Agricultural Experimental Station. Circular S370:1-6.
- Scott, L.E.; Walls, E.P. 1947.** Ascorbic acid content and sugar-acid ratios of fresh fruit and processed juice of tomato varieties. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 50:269-272.
- Serrani, J.C.; Fos, M.; Atarés, A.; García-Martínez, J.L. 2007a.** Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv *Micro-Tom* of tomato. *J. Plant Growth Regul.* 26: 211-221.
- Serrani, J.C.; Sanjuan, R.; Ruiz-Rivero, O.; Fos, M; García-Martínez, J.L. 2007b.** Gibberellin regulation of fruit-set and growth in tomato. *Plant Physiol.* 145: 246-257.
- Serrani, J.C. 2008.** *Interacción de giberelinas y auxinas en la fructificación del tomate.* Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.
- Serrano-Megias, M.; Lopez-Nicolás, J.M. 2006.** Application of agglomerative hierarchical clustering to identify consumer tomato preferences: influence of physicochemical and sensory characteristics on consumer response. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 86:493-499.

Seymour, G.B.; Colquhoun, I.J.; Dupont, M.S.; Parsley, K.R.; Selvendran, R.R. 1990. Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochemistry* 29 (3): 725-731.

Seymour, G.B.; Harding, S.; Taylor, A.; Hobson, G.; Tucker, G. 1987. Polyuronide solubilisation during ripening of normal and mutant tomato fruit. *Phytochemistry* 26: 1971–1976.

Shabtai, S.; Salts, Y.; Kaluzky, G.; Barg, R. 2007. Improved yielding and reduced puffiness under extreme temperatures induced by fruit-specific expression of *ro1B* in processing tomatoes. *Theor Appl Genet*, 114:1203–1209.

Shewfelt, R.L. 2000. Fruits and vegetable quality, 144-157 pp. In Shewfelt RL y Bruckner B (eds.) *Fruits and vegetables quality. An integrated view.* CRC Press. London.

Shewfelt, R.L.; Thai, C.N.; Davis, J.W. 1988. Prediction of changes in color of tomatoes during ripening at different constant temperatures. *J. Food Sciences* 53 (5): 1433-1437.

Shi, J; Le Marguer, M. 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Biotechnol.* 20, 293-334.

Shook, C.M.; Shellhammer, T.H.; Schwartz, S.J. 2001. Polygalacturonase, pectinase and lyxoygenase activities in high pressure diced tomatoes. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 664-668.

Silverstone, A.L.; Tseng, T-S.; Swain, S.M.; Dill, A.; Jeong, S.Y.; Olszewski, N.E.; Sun, T-p. 2006. Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 143: 987-1000.

Simkin, A. J.; Schwartz, S. H.; Auldridge, M.; Taylor, M. G.; Klee, H. J. 2004. The tomato carotenoid *cleavage dioxygenase 1* genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *The Plant Journal*, 40: 882-892.

Sjut, V.; Bangerth, F. 1981. Effect of pollination or treatment with growth regulators on levels of extractable hormones in tomato ovaries and young fruits. *Physiol. Plant.* 53: 76-78.

Smeaton, J. R.; Elliot, W. H. 1967. Isolation and properties of a specific bacterial ribonuclease inhibitor. *Biochem. Biophys. Acta.* 145: 547-560.

Smith, D.L.; Gross, K.C. 2000. A family of at least seven betagalactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiology*, 123: 1173-1183.

Smith, O. 1935. Pollination and life-history studies of the tomato. *Cornell University Agric. Exp. Sta. Men.* 182: 3-6.

Smulders, M.J.M.; Rus-Kortekaas, W.; Gilissen, L.J.W. 1994. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Sci.* 97:53–60.

Soressi, G. P. 1970. Tomato mutants following EMS seed treatments. TGC Reports. 20, 59.

Soressi, G. P.; Salami, F. 1975. A monomendelian gene inducing parthenocarpic fruits. TGC Reports. 25, 22.

Speirs, J.; Lee, E.; Holt, K.; Yong-Duk, K.; Scott, N. S.; Loveys, B. Y Schuch, W. 1998. Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affect the balance of some flavor aldehydes and alcohols. Plant Physiology, 117: 1047-1058.

Sponsel, V.M. 1995. Gibberellin biosynthesis and metabolism. In: Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Davies PJ (ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 66-97.

Sponsel, V.M; 1983. The localization, metabolism and biological activity of gibberellins in maturing and germinating seeds of *Pisum sativum* cv. Progress, 9. Planta 159: 454-468.

Srivastava, A.; Handa, A.K. 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. J. Plant Growth Regul, 24: 67-82.

Srivastava, L.M. 2002. Plant Growth and Development. Hormones and Environment. Academic Press. London, UK. 166-167.

Staswick, P.E.; Serban, B.; Rowe, M.; Tiryaki, I.; Maldonado, M.T.; Maldonado, M.C.; Suza, W. 2005. Characterization of an Arabidopsis Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. The Plant Cell, 17: 616-627.

Stevens, M.A. 1979. Tomato quality: Potential for developing cultivars with improved flavour. Acta Horticulturae 93: 317–329.

Stevens, M.A.; Kader, A.A.; Albright-Holton, M.; Algazi, M. 1977. Genotypic variation for flavour and composition in fresh market tomatoes. J. Am. Soc. Hort. Sci. 102: 680-689.

Stommel, J.R.; Abbott, J.; Saftner, R.A.; Camp, M.J. 2005. Sensory and objective quality attributes of beta- carotene and lycopene-rich tomato fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130: 244-251.

Sulston, J. E.; White, J. G. 1980. Regulation and cell anatomy during postembryonic development of *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol. 78: 577-597.

Sun, T-p.; Gubler, F. 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. Annu Rev Plant Biol, 55:197-223.

Takahashi, H.; Tiba, M.; Iino, M.; Takayasu, T. 1955. The effect of γ -aminobutyric acid on blood pressure. Jpn. J. Physiol. 5, 334-341.

Talón, M. 2000. Giberelinas. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto J y Talón M (eds). Interamericana Mc Graw Hill, España, 325-341.

Tanaka, H.; Dhonukshe, P.; Brewer, P. B.; Friml, J. 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci.* 63: 2738-54.

Tandon, K.S.; Abegaz, E.; Shewfelt, R.L.; Balwin, E.A.; Scott, J.W. 2000. Interrelationship of sensory descriptors and chemical composition as affected by harvest maturity and season on fresh tomato flavour. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 113.

Tandon K.S.; Baldwin E. A.; Scott J. W.; Shewfelt R. L. 2003. Linking sensory descriptors to volatile and nonvolatile components of fresh tomato flavour. *Journal of food science*, 68 (7): 2366-2371.

Tanksley, S.D.; Ganai, M.W.; Prince, J.P.; Vicente, M.C.; Bonierbale, M.W.; Broun, P.; Fulton, T.M.; Giovannoni, J.J.; Grandillo, S.; Martin, G.B.; Messeguer, R.; Miller, J.C.; Miller, L.; Paterson, A.H.; Pineda, O.; Riider, M.S.; Wing, R.A.; Wu, W.; Young, N.D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*. 132: 1141-1160.

Thimm, O.; Blasing, O.; Gibon, Y.; Nagel, A.; Meyer, S.; Kruger, P.; Selbig, J.; Muller, L.A.; Rhee, S.Y.; Stitt, M. 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 37: 914–939.

Thomas, S.G.; Rieu, I.; Steber, C.M. 2005. Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam Horm*, 72: 289-338.

Thomas, S.G.; Sun, T-p. 2004. Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol*, 135: 668-676.

Thompson, D.S.; Davies, W.J.; Ho, L.C. 1998. Regulation of tomato fruit growth by epidermal cell wall enzymes. *Plant Cell and Environment* 21(6): 589-599.

Thorsness, M. K.; Nasrallah, J. B. 1995. Cell-specific ablation in plants. *Methods in Cell Biology*. 50: 439-448.

Thybo, A. K.; Bechmann, I. E.; Brandt, K. 2005. Integration of sensory and objective measurements of tomato quality: Quantitative assessment of the effect of harvest data as compared with growth medium (soil versus rockwool), EC, variety, and maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2289–2296.

Tikunov, Y.; Lommen, A.; de Vos, C.H.R.; Verhoeven, H.A.; Bino, R.J.; Hall, R.D.; Bovy, A.G. 2005. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiology* 139: 1125-1137.

Tronickova, E. 1962. New type of functional male sterility in tomato. *Ved Prace Vysk Ust Rostl Vyr Praha-Ruzine* 6: 29–39.

Tuskan, G.A.; Difazio, S.; Jasón, S.; Bohlmann, J.; Grigoriev, I.; Hellsten, U.; Putnam, N.; Ralph, S.; Rombauts, S.; Salamov, A. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr & Gray). *Science*, 313: 1596-1604.

Tusher, V.G.; Tibshirani, R.; Chu, G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5116-21.

UNE, 87-001-94. 1994. Análisis sensorial. Vocabulario. Madrid. España. Asociación Española de Normalización y Certificación.

Usadel, B.; Nagel, A.; Thimm, O.; Redestig, H.; Blaesing, O.E.; Palacios-Rojas, N.; Selbing, J.; Hannemann, J.; Piques, M.C.; Steinhauser, D.; Scheible, W.R.; Gibon, Y.; Morcuende, R.; Weicht, D.; Meyer, S.; Stitt, M. 2005. Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol*, 138: 1195-1204.

Valero, M.P.; Fletcher, A.E.; Stavola, B.D.; Vioque, J.; Alepuz, V.C.; de Stavola, B.L. 2002. Vitamin C is associated with reduced risk of cataract in a Mediterranean population. *J. Nutr.* 132: 1299-1306.

Vallejo, C. F. A. 1999. Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Cali. Colombia. p. 209.

Van den Heuvel, K.J.P.T.; Van Esch, R.J.; Barendse, G.W.M.; Wullems, G.J. 1999. Isolation and molecular characterization of gibberellin-regulated H1 and H2B histone cDNAs in the leaf of the gibberellin-deficient tomato. *Plant Mol. Biol.*, 39: 883–890.

Van Huizen, R.; Ozga, J.A.; Reinecke, D.M. 1997. Seed and hormonal regulation of gibberellin 20-oxidase expression in pea pericarp. *Plant Physiol*, 115: 123-128.

Vardy, E.; Lapushner, D.; Genizi, A.; Hewitt, J. 1989. Genetics of parthenocarpy in tomato under a low temperature regime: II. Cultivar Severianin *Euphytica* 41:9–15.

Varga A, Bruinsma J. 1986. Tomato. In: *CRC Handbook of Fruit Set and Development*, Monselise SP (ed). Boca Raton FL. CRC Press. 461-480.

Veit, K.U.; Krumbein, A.; Kosegarten, H. 1999. Effect of different water supply on plant growth and fruit quality of *Lycopersicon esculentum*. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 162: 583-588.

Velasco, R.; Zharkikh, A.; Troggio, M.; Cartwright, D.A.; Cestaro, A.; Pruss, D.; Pindo, M.; Fitzgerald, L.M.; Vezzulli, S.; Reid, J. 2007. The high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLOS ONE* 2: e1326.

Verhoeven, M. E; Bovy, A; Collins, G; Muir, S; Robinson, S; de Vos, C.H. R.; Colliver, S. 2002. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 53 (377): 2099-2106.

Vivian-Smith, A.; Koltunow, A. 1999. Genetic Analysis of Growth-Regulator-Induced Parthenocarpy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 121: 437–451.

Vivian-Smith, A.; Luo, M.; Chaudhury, A.; Koltunow, A. 2001. Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development*, 128: 2321-2331.

Vriezen, W.H.; Feron, R.; Maretto, F.; Keijman, J.; Mariani, C. 2008. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist*, 177: 60-76.

- Wang, C.; Chin, C.K.; Ho, C.T.; Hwang, C.F.; Polashock, J.J.; Martin, C.E. 1996.** Changes of fatty acids and fatty acid-derived flavour compounds by expressing the yeast delta-9 desaturase gene in tomato. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3399-3402.
- Wang, H.; Jones, B.; Li, Z.; Frasse, P.; Delalande, C.; Regad, F.; Chaabouni, S.; Latché, A.; Pech, J.-C.; Bouzayen M. 2005.** The tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17: 2676-2692.
- Wang, H.; Schauer, N.; Usadel, B.; Frasse, P.; Zouine, M.; Hernould, M.; Latché, A.; Pech, J.C.; Fernie, A.R.; Bouzayen, M. 2009.** Regulatory Features Underlying Pollination-Dependent and -Independent Tomato Fruit Set Revealed by Transcript and Primary Metabolite Profiling. *The Plant Cell* 21: 1428-1452.
- Wilson, L.A; Sterling, C. 1976.** Studies on the cuticle of tomato fruit. I. Fine structure of the cuticle. *Z. PflanzenPhysiol.* 77: 359-371.
- Xiao, H.; Radovich, C.; Welty, N.; Hsu, J.; Li D.M.; Meulia, T.; van der Knaap, E. 2009.** Integration of tomato reproductive developmental landmarks and expression profiles and the effect of SUN on fruit shape. *BMC Plant Biology*, 9.
- Yamaguchi, S. 2007.** Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 59:225-251.
- Yamaguchi, S.; Kamiya, Y. 2000.** Gibberellin Biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol.* 41: 251-257.
- Yamamoto, N.; Tsugane, T.; Watanabe, M.; Yano, K.; Maeda, F.; Kuwata, C.; Toriki, M.; Ban, Y.; Nishimura, S.; Shibata, D. 2005.** Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. *Gene* 356: 127-134.
- Yang, M.C.; Ruan, Q.G.; Yang, J.J.; Eckenrode, S.; Wu, S.; McIndoe, R.A.; She, J.X. 2001.** A statistical procedure for flagging weak spots greatly improves normalization and ratio estimates in microarray experiments. *Physiol. Genomics.* *Physiol. Genomics Articles in Press.*
- Yang, Y.H.; Speed, T. 2002.** Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat. Rev. Genet.* 3:579-588.
- Yang, Y.H.; Dudoit, S.; Luu, P.; Lin, D.M.; Peng, V.; Ngai, J.; Speed, T.P. 2002.** Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30:e15.
- Yano, K.; Aoki, K.; Shibata, D. 2007.** Genomics databases for tomato. *Plant Biotechnology* 24:17-25.
- Yao, J.-L.; Dong, Y.-H.; Morris, B. A. M. 2001.** Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *PNAS.* 30: 1306-1311.
- Yeatman, J.N. 1969.** Tomato products: Read tomato red. *Food Technol*, 23: 618-627.

Ying, Z.; Malinowsky, R.; Ziolkowska; Sommer, H.; Plader, W.; Malepszy, S. 2006. Cellular and molecular biology letters. 11: 279-290.

You, W.C.; Zhang, L.; Chang, Y.S.; Liu, W.D.; Ma, J.L.; Li, J.Y.; Jin, M.L.; Hu, Y.R.; Yang, C.S.; Xu, G.W. 2000. Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. J. Ntl. Cancer I. 92: 1607-1612.

Yousef, G.G.; Juvik, J.A. 2001. Evaluation of breeding utility of a chromosomal segment from *Lycopersicon chmielewskii* that enhances cultivated tomato soluble solids. Theor. Appl. Genet. 103: 1022-1027.

Yu, L. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa*, L. ssp. indica). Science, 296 (5565): 79-92.

Yuan, Q.P. 2005. The institute for genomic research Osa1 rice genome annotation database: Plan Physiology, 138 (1): 17-26.

Zhan, X-y.; Wu, H-m.; Cheung, A. Y. 1996. Nuclear male sterility induced by pollen-specific expression of a ribonuclease. Sex. Plant Reprod. 9: 35-43.

Zhang, H.; Srenivasulu, N.; Weschke, W.; Stein, N.; Rudd, S.; Radchuk, V.; Potokina, E.; Scholz, U.; Schweizer, P.; Zierold, U. 2004. Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags. Plant J. 40: 276-290.

Zerbini, P.E.; Gorini, F.; Polesello, A. 1991. Measurement of the quality of the tomatoes: Recommendations of an ECC working group. IVTPA. Milano.

Zierler, B.; Siegmund, B.; Pfannhauser, W. 2004. Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 520:3-11.

Zijlstra, S. 1985. Parthenocarpie in tomaat; twee nieuwe lijnen uit soortkruising. Zaadbelangen, 4: 92-94.

<http://atarrays.tigr.org/PDF/Aminoallyl.pdf>

<http://gabi.rzpd.de/projects/Mapman/>

<http://rsbweb.nih.gov/ij/>

<http://soybeangenomics.cropsci.uiuc.edu/>

<http://ted.bti.cornell.edu>

<http://www.appliedbiosystems.com>

<http://www.arabidopsis.org/portals/masc/index.jsp>

<http://www.btny.purdue.edu/usdars/wheatgen/index.html>

<http://www.corning.com/lifesciences>

<http://www.jspcmb.jp/pbcontents/pb22-2.html>

<http://www.maizegdb.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.noble.org/medicago/>

<http://www.sgn.cornell.edu>

<http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato project/>

<http://www.sgn.cornell.edu/index.html>

<http://www.usricegenome.org/tdb/potato>

VIII. Anexos



VIII. Anexos

Anexo I. Tabla de abundancias relativas de los 53 compuestos volátiles que fueron identificados en los frutos de todos los genotipos evaluados.

Anexo II. Tabla abundancias relativas de los 26 metabolitos primarios identificados en los frutos de los cultivares MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1.

Anexo III. Descripción de los genes diferencialmente expresados (1,5 fold) en los 5 estadios de desarrollo.

Anexo IV. Descripción de la micromatriz TOM2; oligos impresos en la micromatriz, códigos de operon, SGN y anotaciones.

Anexo V. Visualización, mediante el programa Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos asociados con el metabolismo de los ovarios *PsEND1::barnasa* comparándolos con los ovarios silvestres, en los estadios 2, 3 y 5 del desarrollo.

